

Die Entwicklung der Maden der forensisch relevanten Schmeißfliegenart *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae) im Substratvergleich

Dissertation

zur Erlangung doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Von Martin Frank Stephan Rössel

geboren am 05.11.1985 **in** Kassel, Hessen (Deutschland)

Gutachter

1. Frau Prof. Dr. med. Gita Mall, Institut für Rechtsmedizin, Universitätsklinikum Jena
2. Herr Prof. Dr. rer. nat. Rolf Beutel, Institut für Spezielle Zoologie und Evolutionsbiologie, Friedrich-Schiller-Universität Jena
3. Frau Prof. Dr. med. Britta Bockholdt, Institut für Rechtsmedizin, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Tag der öffentlichen Verteidigung: 02.07.2019

1 Inhaltsverzeichnis

1	Inhaltsverzeichnis	3
2	Abkürzungsverzeichnis	4
3	Zusammenfassung	5
4	Einleitung	6
5	Ziele der Arbeit	13
6	Methodik	14
6.1	Gewinnung und Zucht der Elterngenerationen	14
6.2	Futtersubstrat	16
6.3	Versuchsaufbau, Durchführung und Asservation	17
6.4	Vermessung und Rohdaten	19
6.5	Datenaufbereitung und statistische Auswertung	23
7	Ergebnisse	24
7.1	Datenauswertung und deskriptive Statistik	24
7.2	Filterung und Datenaufbereitung	37
7.3	Statistische Auswertung und Testung	39
8	Diskussion	47
9	Schlussfolgerung	51
10	Literatur- und Quellenverzeichnis	53
11	Anhang	58
11.1	Abbildungsverzeichnis	58
11.2	Tabellenverzeichnis	60
11.3	Lebenslauf	Fehler! Textmarke nicht definiert.
11.4	Danksagung	61
11.5	Ehrenwörtliche Erklärung	62

2 Abkürzungsverzeichnis

ADD	accumulated degree days
ADH	accumulated degree hours
ANOVA	analysis of variances
BMI	Body-Mass-Index
DTT	developmente temperature threshold
PMI _{min}	minimales postmoraes Intervall

3 Zusammenfassung

Die forensische Entomologie befasst sich mit der Erforschung der Leichenfauna mit dem Ziel, Aussagen für die Bestimmung des minimalen postmortalen Intervalls (PMI_{min}) treffen zu können. Die existierenden Vergleichsdaten, welche für die Bestimmung der PMI_{min} herangezogen werden, basieren bisher jedoch ausschließlich auf Laborversuchen mit tierischen Futtersubstraten. Hier setzt die vorliegende Arbeit an, und erforscht die Frage, ob es einen signifikanten Unterschied im Wachstum der Maden von *Calliphora vicina* (*C. vicina*) (Diptera: Calliphoridae) auf menschlichem Substrat im Vergleich zu der Entwicklung auf dem Substrat vom Schwein gibt.

Zur Ermittlung der Daten wurden Larven von *C. vicina* in je vier Versuchswiederholungen unter konstanten Laborbedingungen bei 21°C, 60% Luftfeuchtigkeit und 16h-zu-8h-Hell-Dunkel-Zyklus auf Muskel humanen und porkinen Ursprungs gezüchtet. Stichproben wurden alle 12 h entnommen und die gewonnen Maden leitliniengerecht asserviert und gelagert (Amendt et al. 2007). Nach Vermessung der Längen aller asservierten Maden wurden die Ergebnisse gesichtet und statistisch ausgewertet.

Die erhobenen Daten ergaben signifikante Unterschiede für das Wachstum von *C. vicina* auf den getesteten Substraten, wobei die Larven auf humanem Substrat schneller wuchsen, und ihre Entwicklung bis zu 22,5 h früher abschlossen. Dieses Ergebnis bedeutet eine mögliche Überschätzung des PMI_{min} von bis zu 24 h.

Die Verwendung von einem nicht-menschlichem Substrat zur Gewinnung von Vergleichsdaten, das in gerichtsmedizinischen Fällen zur Abschätzung des PMI_{min} herangezogen wird, ist mit Blick auf diese Ergebnisse kritisch zu hinterfragen. Um die PMI_{min} -Bestimmung durch entomologische Methoden weiter verbessern zu können, ist es nötig, das Wachstumsverhalten für jede zu untersuchende Fliegenart auf humanem Substrat zu studieren, und Vergleichsdaten für zukünftige Studien bereitzustellen.

4 Einleitung

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit einem speziellen Teilgebiet der Rechtsmedizin, der forensischen Entomologie.

Zu den Aufgaben der Rechtsmedizin gehören nicht zuletzt die Abschätzung der Zeit zwischen dem Auffinden einer Leiche und dem Todeszeitpunkt. Für die Bestimmung dieses minimalen postmortalen Intervalls (PMI_{min}) stehen der Rechtsmedizin mehrere Methoden zur Verfügung. Die erste Vorgehensweise stellt die ärztliche Leichenschau mit Beurteilung der sicheren Todeszeichen wie Leichenstarre, Leichenflecke, Fäulnis und nicht mit dem Leben vereinbare Verletzungen dar. Von diesen Merkmalen lassen sich die drei erstgenannten sicheren Todeszeichen zu den zeitabhängigen Kriterien zählen, die wiederum abhängig sind von Umwelteinflüssen wie Temperatur und Luftfeuchtigkeit und von leichenspezifischen Faktoren wie Body-Mass-Index (BMI), Bekleidung, Muskelmasse und Blutgehalt (Brinkmann und Madea 2004). Die Abfolge und das zeitliche Auftreten dieser Kriterien sind gut untersucht, und gehören zu der Ausbildung eines jeden Mediziners. Sollte jedoch durch fortgeschrittene Verwesung und Zerfall eine Bestimmung dieser Merkmale nicht mehr möglich sein, so wird mittels Befragung von Zeugen durch die Polizei und durch Untersuchung des Fundortes versucht, die Zeit des Todes einzugrenzen.

Zu den an einer Leiche auffindbaren Indizien, die zur Todeszeitbestimmung genutzt werden können, gehören auch alle Lebewesen, die an der Zersetzung eines Leichnams beteiligt sind. Dazu zählen Mikroben, Pilze, Insekten und andere Aasfresser (Iancu et al. 2015). Zu den am häufigsten vorgefunden Lebewesen gehören die Insekten, welche im gesamten Ökosystem eine entscheidende Rolle als Verwerter sterblicher Überreste spielen. Ein Teilgebiet der Entomologie, also der wissenschaftlichen Erfassung und Erforschung von Insekten, ist die rechtsmedizinische Entomologie, welche sich mit der Kolonisation des menschlichen Leichnams durch Insekten und deren Entwicklung auf dem Leichnam befasst. (Catts und Goff 1992, Arnaldos et al. 2005, Baque und Amendt 2013, Hall und Donovan 2001).

Zu den ersten an einer Leiche gefundenen Insektenfamilie gehören Studien zufolge Schmeißfliegen (Diptera: Calliphoridae), die weltweit mit circa 1000 Arten vertreten sind, von denen bisher 45 als auch in Deutschland vorkommend beschrieben wurden (Hecht 2005, Wartenberg 2012). Alle Vertreter der Diptera (Zweiflügler) gehören zu den holometabolen Insekten und durchlaufen demnach eine vollständige Metamorphose vom Ei über Larven- und Puppenstadien hin zu dem adulten Insekt. Abbildung 1 stellt im Uhrzeigersinn die Entwicklungsstadien einer Schmeißfliege vom Ei, meist in Ballen gelegt, über die Larvenstadien erstes bis drittes Instar, bis hin zur Puppe dar, aus der die adulten Fliegen (Imagines) schlüpfen.



Abbildung 1: Entwicklungsstadien von Schmeißfliegen (by M.Hall, Natural History Museum, London)

Fliegenmaden vollziehen ihre komplette Entwicklung vom Ei bis zu dem letzten Larvenstadium auf der Leiche, und verlassen diese meist erst zum Aufsuchen eines geeigneten Ortes für ihre Verpuppung. Der am besten geeignete Parameter für die Altersbestimmung ist die Länge einer Larve (Baque et al. 2015).

In Deutschland und Europa gehören zu den häufigsten Arten, welche auf menschlichen Leichen gefunden werden, *Calliphora vomitoria* (*C. vomitoria*) (Linnaeus 1758), *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy-1830), *Lucilia sericata* (*L. sericata*) (Meigen 1826), *Protophormia terraenovae* (*P. terraenovae*) (Robineau-Desvoidy-1830) und *Phormia regina* (*P. regina*) (Meigen 1826) (Anderson 2011, Schröder et al. 2001, Grassberger und Frank 2004, Schroeder et al. 2003, Fremdt und Amendt 2014, Prado e Castro et al. 2012).

Calliphora vicina (Diptera: Calliphoridae) stellt sich als besonders geeignete Schmeißfliegenart mit forensischer Relevanz für die entomologische Todeszeitbestimmung unter den Kriterien der Verbreitung, des synanthropen Verhaltens, und der Aktivität während der Jahreszeiten dar. Die genaue Einordnung innerhalb der Diptera und Calliphoridae ist in Abbildung 2 genauer dargestellt.

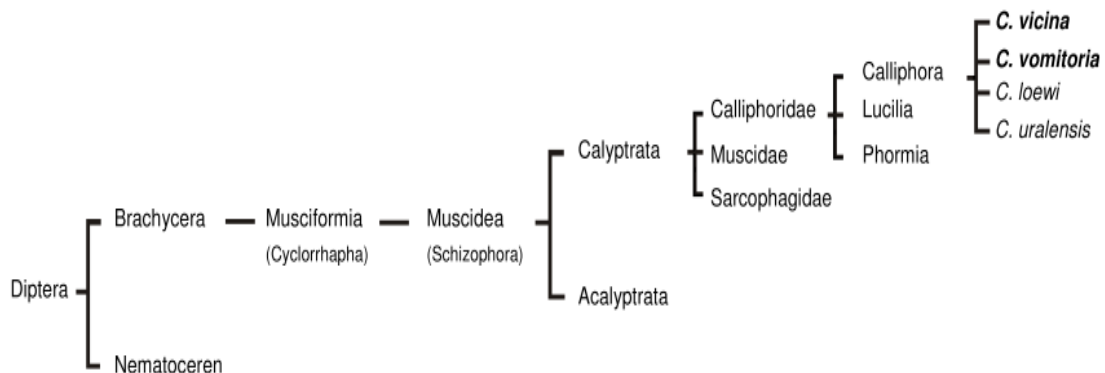


Abbildung 2: Taxonomie von *Calliphora vicina*, Stellung innerhalb der Diptera (Wartenberg 2012)

C. vicina gehört wie andere Vertreter der Calliphoridae zu den ersten Arten, die an einer Leiche anzutreffen sind, mitunter schon in den ersten 15min nach Eintritt des Todes. Sie nimmt in der Sukzession und im Abbau eines Kadavers eine führende Rolle ein. Darüber hinaus weist *C. vicina* auch eine Aktivität bei niedrigen Umgebungstemperaturen auf, welches sie von vielen anderen Vertretern ihrer Gattung unterscheidet. Dies begründet auch für relativ kühle Jahreszeiten eine forensisch-entomologische Relevanz (Campobasso et al. 2001, Matuszewski et al. 2008, Matuszewski et al. 2010b, Grassberger und Frank 2004, Schroeder et al. 2003, Anton et al. 2011). Weiterhin hervorzuheben

ist, dass *C. vicina* zu den Arten gehört, die bei Fällen im häuslichen Umfeld anzutreffen sind, und der eine synanthrope Verbreitung nachzuweisen ist. Dagegen gehört *C. vicina* bei Fällen in den ländlichen oder naturbelassenen Regionen nicht zu den dominanten Arten (Pohjoismaki et al. 2010, Reibe und Madea 2010, Prado e Castro et al. 2012, Fremdt und Amendt 2014).

Einen für Laborexperimente günstigen Umstand stellt dar, dass *C. vicina* als Generalist klassifiziert werden kann, auf deren Wachstumsverhalten die Aufbereitung des Futtersubstrates keinen signifikanten Einfluss hat (Wartenberg 2012, Niederegger et al. 2013).

Für die verwandte *Calliphora augur* (*C. augur*) konnte kein signifikanter Unterschied bei Verwendung von tiefgekühltem und wieder aufgetautem Futtersubstrat, im Vergleich zu frischem Nährmedium festgestellt werden (Day und Wallman 2006b). Unter Berücksichtigung, dass Erkenntnisse zum Wachstumsverhalten und zur Ausprägung von Einflussfaktoren auf selbige für eine Art nur eingeschränkt übertragbar sein können, kann bei Verwendung von tiefgefrorenem und wieder aufgetautem Substrat jedoch von einem geringem bis nicht signifikanten Einfluss auf Larven von *C. vicina* ausgegangen werden.

Bei der Bestimmung des PMI_{min} durch die forensische Entomologie werden Daten zur zeitlichen Abfolge der Besiedelung, der sogenannten Sukzession, genutzt. Diese sind weltweit rar gesät, weil die vorkommenden Arten und ihre zeitliche Abfolge stark von Klima und geographischer Lage abhängig sind. Für Europa sind wissenschaftliche Arbeiten, die sich explizit mit der Sukzession beschäftigen, in den letzten zwei Jahrzehnten angefertigt worden, wobei sich die Autoren einig sind, dass es noch weiterer und ausführlicherer Feldversuche bedarf (Matuszewski et al. 2008, Matuszewski et al. 2010a, Schröder et al. 2001, Grassberger und Frank 2004, Schroeder et al. 2003, Pohjoismaki et al. 2010, Fremdt und Amendt 2014, Baz et al. 2015, Anton et al. 2011).

Da die Sukzession einen fließenden Prozess darstellt, dessen Zeiten in Tagen bis Wochen bemessen werden, ist es zur genaueren Abschätzung des PMI_{min} relevant, das Alter, der auf der Leiche gefundenen Entwicklungsstadien der Fliegenarten möglichst exakt zu bestimmen. Dies ist möglich durch die

Vermessung der Länge, des Gewichtes, der Bestimmung des Larvenstadiums und der exakten Artbestimmung der Insekten.

Die Entwicklung verläuft artspezifisch und wird in ihrer Geschwindigkeit von Umweltfaktoren beeinflusst. Als wichtigster Faktor wurde die Umgebungstemperatur identifiziert, da Insekten als poikilotherme (wechselwarme) Lebensformen von der Umgebungstemperatur abhängig sind (Reiter 1984, Donovan et al. 2006, Ames und Turner 2003, Williams und Richardson 1984, Niederegger et al. 2010, Campobasso et al. 2001). Ebenso ist es für die Bestimmung des PMI_{min} durch die forensische Entomologie von Bedeutung, in die Kalkulation möglichst alle relevanten Einflussfaktoren auf das Wachstum der Insekten einfließen zu lassen (Campobasso et al. 2001, Mohr und Tomberlin 2014). Zu diesen relevanten Einflussfaktoren zählen unter anderem Zugänglichkeit, Größe und Wunden bzw. Öffnungen des Kadavers, Wetterlage, Sonnenlichtstunden pro Tag, Umgebungsfeuchtigkeit, Madenmasse, sowie Predatoren und Parasiten für Nekrophagen. Sie wurden bereits in wissenschaftlichen Studien beschrieben, aber noch nicht ausreichend untersucht (Campobasso et al. 2001). Deshalb bedarf es ausgedehnter Forschung, um die Wechselwirkungen und Auswirkungen auf die PMI_{min}-Bestimmung besser zu verstehen, da es durch Unter- oder Überschätzungen des PMI_{min} zu massiven Abweichungen vom tatsächlichen Todeszeitpunkt kommen kann (VanLaerhoven 2008).

Als wichtigster Einflussfaktor wurde bereits die Temperatur genannt. Von den Bedingungen, welche die Umgebungstemperatur für wachsende Maden beeinflussen, darf insbesondere die durch Madenmassen generierte Wärme mit Regulationsmechanismen und Effekten auf das Wachstum nicht vernachlässigt werden. Dies wurde bereits Gegenstand der aktuellen Forschung, die einen entscheidenden Einfluss auf die PMI_{min}-Schätzung durch intrinsische Wärmeproduktion und -regulation von Madenmassen belegen konnte (Ireland und Turner 2006, Slone und Gruner 2007, Charabidze et al. 2011, Johnson und Wallman 2014).

Weiterhin haben fluktuierende Temperaturen, denen die Fliegenmaden während ihres Wachstums ausgesetzt sind, Auswirkungen auf die Abschätzung des PMI_{min}. Einige Arten weisen schnelleres Wachstum unter konstanten

Temperaturen auf, während sie bei anderen Arten zu einer Verzögerung des Wachstums führen können. Generell werden konstant niedrige Umgebungstemperaturen das Wachstum aller Arten verzögern, während kurze Kältephasen unbeschadet überstanden werden können (Niederegger et al. 2010, Ames und Turner 2003, Faucherre et al. 1999, Kaneshrajah und Turner 2004).

In diesem Zusammenhang steht die Methode der accumulated degree hours (ADH) / accumulated degree days (ADD), die ein Vergleichbarkeit zwischen Studienergebnissen vereinfachen soll. Dabei wird davon ausgegangen, dass Larven einer spezifischen Insektenspezies von der Eiablage bis zum Schlupf des adulten Insektes eine bestimmte Summe an Wärmeenergie akkumulieren müssen, um ihre Entwicklung abzuschließen. Diese Summe an Wärmeenergie wird in ADH / ADD angegeben und variiert in Abhängigkeit von Umgebungsvariablen, wird aber als konstant für identische Bedingungen angenommen.

Die Wahl des Futtersubstrates muss bei der Kalkulation ebenfalls bedacht werden. So konnte gezeigt werden, dass es signifikante Unterschiede im Wachstum in Abhängigkeit von dem Ursprung des Substrates geben kann. Beispielhaft konnte für *L. sericata* gezeigt werden, dass auf Herz und Lunge von Rind und Schwein gezüchtete Maden, ihre Entwicklung schneller abschlossen, als auf Leber herangezogene. Ebenso wuchsen Maden von *L. sericata* auf dem Substrat vom Schwein schneller als auf Substrat vom Rind (Clark et al. 2006). Day und Wallmann konnten bei *C. augur* und *Lucilia cuprina* (*L. cuprina*) ähnliche Ergebnisse feststellen und sogar Leber als Substrat für PMI_{min} relevante Vergleichsuntersuchungen ausschließen (Day und Wallman 2006a). Für *C. vicina* und *C. vomitoria* - zwei verwandte Arten - konnte gezeigt werden, dass das Wachstum stark abhängig von der verwendeten Tierart, Aufbereitung und Zusammensetzung des Futtersubstrates ist (Wartenberg 2012, Niederegger et al. 2013).

Dennoch wurden in bisherigen Veröffentlichungen verschiedene Futtersubstrate in unterschiedlichen Aufbereitungsformen und Zusammensetzungen verwendet, da es bisher keinen einheitlichen Standard für Nährmedien gibt. Dabei reichen die gewählten Substrate von artifiziellen Diäten (Tachibana und Numata 2001,

Daniels et al. 1991) über die Verwendung verschiedener Spenderspezies wie Ratten (Aubernon et al. 2015), Schwein (Ireland und Turner 2006, Kaneshrajah und Turner 2004), Rind (Grassberger und Reiter 2002, Roe und Higley 2015, Baque und Amendt 2013), Pferd (Simkiss et al. 1993), Schaf (Day und Wallman 2006a, Donovan et al. 2006) bis hin zu gemischten Substraten unterschiedlicher Spenderspezies (Mai und Amendt 2012, Wartenberg 2012, Baque et al. 2015). Es ist gängige Praxis die günstigeren und leichter zu beschaffenen tierischen Produkte, wie zum Beispiel Leber oder gar Hundefutter, für die Laborversuche zu verwenden, obwohl deren Eignung bereits in Frage gestellt wurde (Clark et al. 2006). Untersuchungen, ob eine Vergleichbarkeit im Wachstum auf menschlichen Überresten und auf Substraten, die in Laborversuchen verwendet wurden, gegeben ist, fehlen bis dato.

5 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wird der Frage nachgegangen, inwiefern ein Substrat vom Schwein, hinsichtlich des Einflusses auf das Wachstumsverhalten von Fliegen der Gattung *Calliphora vicina*, vergleichbar mit menschlichen Überresten in medico-legalen Fällen ist.

Um über das Wachstumsverhalten eine adäquate Aussage treffen zu können, werden die Futtersubstrate von porkinem und menschlichem Muskelfleisch verglichen und erforscht, ob das Nährmedium einen signifikanten Unterschied in der Entwicklung der Maden darstellt. Darauf basierend wird herausgearbeitet, inwiefern ein alleiniger Einfluss des Madenwachstums auf das verwendete Substrat zurückzuführen ist, und die Konsequenzen der erhobenen Daten für zukünftige Ausarbeitungen erläutert.

Ziel ist es, auf den erarbeiteten Daten und Erkenntnissen aufbauend, sowohl die Kritik an der bestehenden Datenlage zur Vergleichbarkeit von experimentell genutzten Substraten, als auch eine Grundlage für weitere Forschungen auf diesem Gebiet zu erarbeiten.

6 Methodik

6.1 Gewinnung und Zucht der Elterngenerationen

Zur Etablierung einer stabilen Population von *Calliphora vicina*, die als Grundlage für die Zucht der Elterngenerationen für die Experimente dient, wurden Eier und lebende Maden einerseits von Obduktionen in Thüringen (Deutschland) und andererseits von ausgelegten Tierkadavern gewonnen.

Die Eier und Maden wurden in Faunarien mit 2 cm Einstreu (Sägespäne) und mit ausreichend Futtersubstrat (handelsübliches Hackfleisch vom Schwein), verbracht. Die Einstreu diente den Maden zur Verpuppung, nachdem sich die Larven vom Nährmedium entfernten. Nach der Metamorphose wurde das nicht konsumierte Futtersubstrat entfernt. Die geschlüpften Imagines (adulte Fliegen) wurden auf unterschiedliche Gazezuchtkäfige, anhand ihrer Spezies, aufgeteilt. Den Adulten wurde Wasser und Zucker *ad libitum* zur Verfügung gestellt, des Weiteren wurde ab der zweiten Woche nach dem Schlüpfen Hackfleisch vom Schwein als Proteinquelle angeboten, da diese für weibliche Imagines unabdingbar zur Ausbildung von Ovarien und Eiern sind und gleichzeitig der Vorbereitung der Oviposition (Eiablage) für die Experimentaldurchgänge dienen.

Die Elterngenerationen wurden in Gazezuchtkäfigen, wie auf Abbildung 3 dargestellt, unter konstanten Laborbedingungen, von 21°C und 60% relative Luftfeuchtigkeit bei 16 h künstlichem Sonnenlicht je Tag, aufgezogen und gehalten. Diese Temperatur liegt innerhalb des vorgesehenen Optimums für *C. vicina* (Hwang und Turner 2009). Weiterhin verhindert der gewählte Beleuchtungszyklus den Eintritt der Tochtergenerationen in die Diapause (Saunders 1997, Nabity et al. 2007). Die konstanten Umweltbedingungen konnten durch den Einsatz eines Klimasimulationsschranks der Firma BINDER GmbH Tuttlingen, ATP.line™ KBWF 720 sichergestellt werden.



Abbildung 3: Gazezuchtkäfig mit circa 100 adulten Fliegen (*C. vicina*) (Wartenberg 2012)

Die Zuchtpopulationen von *C. vicina* wurden über den gesamten Zeitraum des Experimentes in regelmäßigen Abständen durch Wildexemplare aufgefrischt. Dies sollte die genetische Diversität erhalten und zuchtbedingte Gendefekte oder Abweichungen zu der Wildpopulation vermeiden. Die während des Experimentes anfallenden Imagines wurden ebenfalls den Elterngenerationen zugeführt. Zusätzlich wurde bei Bedarf auf handelsüblichem Hackfleisch vom Schwein Nachzuchten angelegt. Dies war nötig, um eine ausreichend hohe Eiablage während der Versuchswiederholungen zu gewährleisten.

In den Gazezuchtkäfigen wurden durchschnittlich 100 bis 200 Adulte gehalten. Da der zur Verfügung stehende Raum in dem Klimasimulationsschrank begrenzt war, wurden auch vormals getrennte Elterngenerationen zusammengeführt.

Bei den Versuchsdurchgängen wurden das Ablageintervall und die Elterngeneration der jeweiligen Stichproben dokumentiert. Die Aufzucht,

Nachzucht und Experimente wurden alle unter konstanten Laborbedingungen in demselben Klimasimulationsschrank durchgeführt, um Störeinflüsse zu minimieren.

6.2 Futtersubstrat

Bei den zu testenden Substraten handelte es sich um Hackfleisch aus Muskel von Schwein und Mensch.

Das Futtersubstrat vom Schwein wurde verzehr-frisch von einem lokalen Metzger als ganzes Filetstück erworben. Anschließend wurde es mit einem handbetriebenen Fleischwolf weiterverarbeitet, um die Portionierung zu erleichtern und bei allen Experimenten ein homogenes Substrat verwenden zu können. Die Portionierung erfolgte in kleine Plastikbecher (Durchmesser 4 cm, Höhe 5.5 cm) mit Schraubdeckelverschluss in 30 +/- 0,5 g Portionen, die anschließend bei -24°C am selben Tag tiefgefroren wurden.

Das humane Futtersubstrat wurde von einem Körperspender gewonnen, dessen Leichnam sich in der Tiefkühleinheit des Instituts für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Jena befand. Nach partiellem Auftauen ausgewählter Körperteile (linker und rechter Arm) wurde das Muskelfleisch von Haut und Sehnen befreit und von den Knochen gelöst. Danach wurde das Fleisch auf gleiche Weise weiterverarbeitet und tiefgefroren.

Am Vortag der geplanten Oviposition wurden vier Becher des Futtersubstrates, Mensch oder Schwein, für den Versuch aus der Tiefkühleinheit entnommen und in einen Kühlschrank mit 7°C +/-1°C über Nacht aufgetaut. Am Tag der Oviposition wurden weitere 20 Becher desselben Futtersubstrates aufgetaut.

6.3 Versuchsaufbau, Durchführung und Asservation

Um die Oviposition vorzubereiten, wurde das Substrat zunächst auf Raumtemperatur erwärmt und anschließend eine Mulde geformt, um die Oberfläche im Substratbehälter zu vergrößern. Die vorbereiteten Becher wurden für je 2 h Intervalle offen den Elterngenerationen zur Verfügung gestellt, um eine ausreichende Eiablage zu gewährleisten. Für jeden Durchlauf wurden zwei sich direkt anschließende Eiablageintervalle von je 2 h Dauer angesetzt. Die Uhrzeiten der Intervalle wurden zusammen mit der Bezeichnung der Elterngeneration (E1 bis E6) dokumentiert und als Nullpunkt für die Auswertungen festgelegt. Nach der Eiablage wurden die Substratbecher in Faunarien (16,0 cm x 9,0 cm x 10,5 cm) mit 2 cm Einstreu verbracht und für 24 h im Klimasimulationsschrank belassen.

Auf Abbildung 4 sind die Faunarien mit Trennwand (**A**), die Verteilung selbiger innerhalb des Klimasimulationsschranks (**B**) und Maden auf Substrat (**C**) zu sehen.

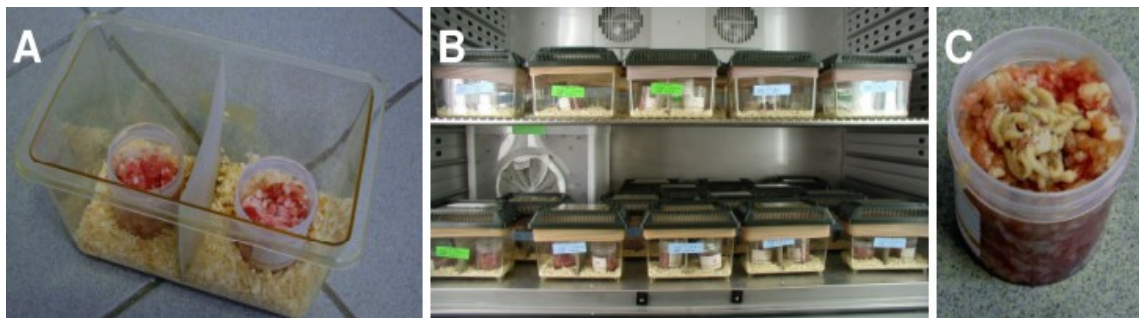


Abbildung 4: Aufbau und Verteilung der Faunarien und Substratbecher. **A** Faunarien mit Einstreu, Trennwand und zwei Substratbechern. **B** Verteilung der Faunarien im Klimasimulationsschrank. **C** Beispielhafter Substratbecher mit Substrat und Maden (Wartenberg 2012)

Nach 24 h wurden die Substratbecher auf das Vorhandensein von Larven überprüft und begonnen vorsichtig mit einem Holzstäbchen je 20 Maden in die vorbereiteten Substratbecher zu überführen. Dies wurde für alle 20 vorbereiteten Becher wiederholt und somit insgesamt 400 Maden je Versuch

verwendet. Die Raumtemperatur betrug bei der Überführung $21 \pm 1^\circ\text{C}$, um eine Abweichung zu den Zuchtbedingungen zu vermeiden.

In ein Faunarium mit Trennwand und 2 cm Einstreu wurden jeweils zwei Becher mit 20 Maden verbracht. Alle Faunarien wurden in dem Klimasimulationsschrank zufällig verteilt und im Verlauf des Experimentaldurchlaufes mehrfach umgestellt, um positionsbedingte Einflüsse zu minimieren. Siehe auch Abbildung 4 (B).

Wenn genügend Larven vorhanden waren, wurde bereits bei der Umbettung bis zu 20 der Maden nach Richtlinien der *European Association for Forensic Entomology* asserviert (Amendt et al. 2007). Die zur Eiablage genutzten Substratbecher wurden ebenfalls in gesonderten Faunarien in dem Klimasimulationsschrank bis zum Schlüpfen von Imagines belassen, um für die Auffrischung der Elterngenerationen zu dienen.

Die Larven von *C. vicina* wurden in wiederholten Versuchen auf beiden Substraten getrennt herangezogen und in festgelegten Zeitintervallen von 12 h stichprobenartig, sowie leitliniengerecht asserviert und vermessen (Amendt et al. 2007). Die Asservation erfolgte durch das Eintauchen der zum Messzeitpunkt entnommenen lebenden Maden und Puppen in Wasser über 80°C , jedoch nicht siedend, für mindestens 30 s und das anschließende Konservieren in 70% vergälltem Ethanol. Ausgeschlossen wurden alle Maden, die nicht sicher als lebendig zu erkennen oder nach einer Suchdauer von 20 min nicht auffindbar waren, um eine Verzerrung der Daten zu vermeiden. Die Entnahme der Substratbecher erfolgte nach dem Zufallsprinzip aus den im Klimasimulationsschrank befindlichen Faunarien. Falls die Migration bereits eingesetzt hatte, wurde auch die Einstreu durchsucht. Datenpunkte wurden alle 12 h, täglich um 7:30 Uhr morgens und 19:30 Uhr abends (bei einem Durchlauf fand die Zeitumstellung von Sommer- auf Winterzeit statt, sodass die Uhrzeiten angepasst werden mussten, um die 12 h Intervalle weiterhin einzuhalten), bis zum Ende eines Durchlaufes durchgeführt. Das Ende eines Versuchs wurde definiert als: „Wenn mehr als 50% der auffindbaren Maden in allen verbleibenden Faunarien bereits verpuppt sind.“ Dieses Kriterium wurde gewählt, um die Verzerrung der Daten durch sogenannte Laggards zu vermeiden. Diese stellen einen Teil der Population dar, die ein verzögertes

Wachstumsverhalten aufweisen und eine signifikant höhere Entwicklungszeit bzw. ADD-/ADH-Summe zum Erreichen der gleichen Länge bzw. Larvenstadiums benötigen (Donovan et al. 2006, Hwang und Turner 2009).

Wenn die Versuchswiederholung aufgrund der zuvor definierten Bedingung beendet werden musste bevor alle dem Versuch zugeordneten Substratbecher verwendet werden konnten, wurden alle übrigen lebenden Maden und Puppen aufbewahrt, um eine genügend große Anzahl an lebendigen Maden für den letzten Messzeitpunkt gewinnen zu können.

6.4 Vermessung und Rohdaten

Die asservierten Maden wurden für mindestens zwei Wochen in 70% Ethanol belassen, bevor sie zur Vermessung kamen. Diese Art der Lagerung hat keinen signifikanten Austrocknungseffekt auf die so gelagerten Maden (Day und Wallman 2008, Richards et al. 2013a).

Die konservierten Maden wurden im Institut für Rechtsmedizin Jena mittels eines Stereomikroskops Stemi 2000-C (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Göttingen) und einer Zeiss AxioCam ICc 1 1,4 Megapixel CCD Kamera an einem PC-Terminal mit der dazu passenden Software (AxioVision40 V4.7.1.0 Copyright ©2006-2008, Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH) auf 0,01mm genau vermessen. Die Messungen wurden als Bilddatei abgespeichert und die Länge jeder Made gesondert notiert.

Zur Vermessung unter dem Mikroskop wurden die Maden in einer Petrischale positioniert und die maximale Länge von Mundhaken bis Körperende gemessen, zu sehen auf Abbildung 5.

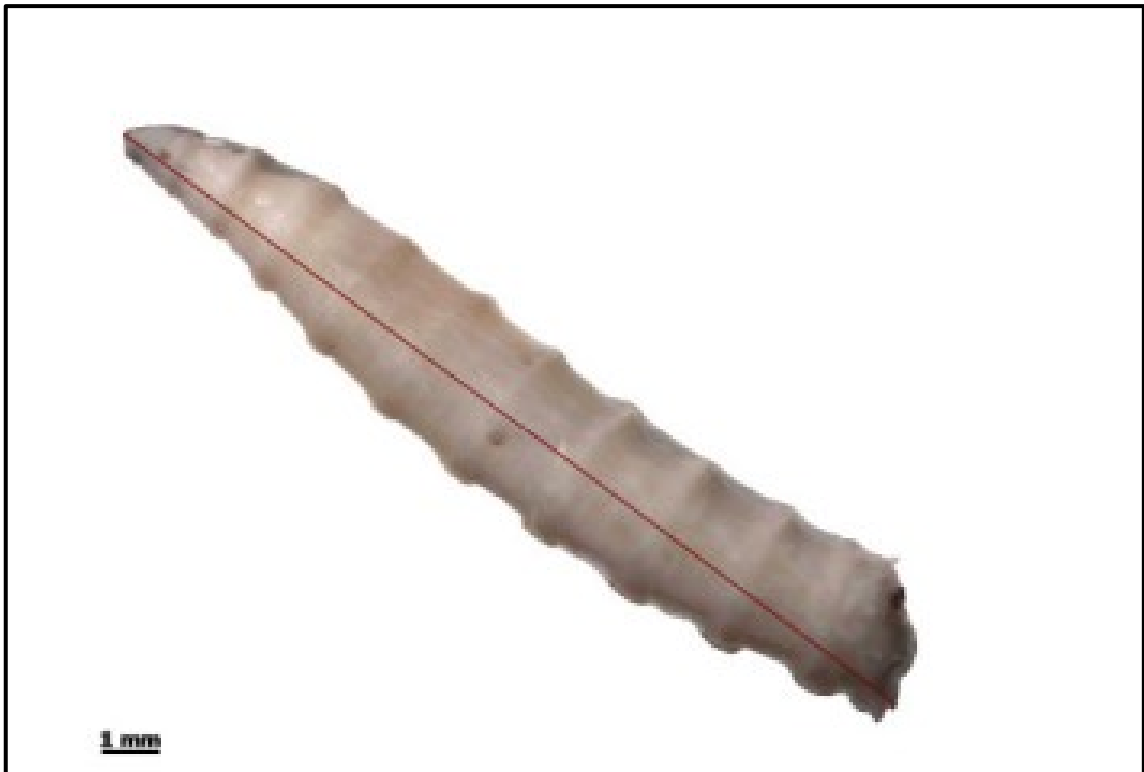


Abbildung 5: Position und Messtrecke exemplarisch an einer Made von *C. vicina* (rote Linie: Messtrecke von rostral zu Ende des letzten Abdominalsegments (Wartenberg 2012))

Alle ermittelten Längen und dazugehörigen Zeitabstände zum Nullpunkt wurden tabellarisch erfasst. Aufgrund biologischer Schwankungen bei dem Schlüpfen der Larven, konnten die einzelnen Versuche nicht immer zur selben Tageszeit begonnen werden. Dadurch treten Abweichungen im Zeitintervall zwischen Eiablage und erstem Datenpunkt (7:30 Uhr morgens oder 19:30 Uhr abends) für jeden Versuch auf. Da dies die Vergleichbarkeit mit statistischen Methoden einschränken kann, wurden Messintervalle von 4 h gewählt. Dabei wurde darauf geachtet, dass jedes Messintervall jeweils Stichproben mit humanem und porkinem Substrat beinhaltete. Durch diese Zuteilung entstanden Zeiträume, die keine Datenpunkte enthalten und deshalb nicht in Messintervalle miteingeschlossen wurden. Die exakte Zuordnung der Messintervalle zu Abschnitten der Zeitachse, sowie in einem Messintervall enthaltene Stichproben mit Versuchsnummer sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Messintervallaufteilung und -zuordnung

Messintervall	Zeit seit Eiablage [h]	Messzeitpunkte(Versuchsnummer)
1	24 - 28	24,25(S_4), 24,58(M_2), 25(M_3), 25,66(S_3), 27,17(M_2)
2	28,5 – 32,5	28,5(M_4), 29,5(S_4), 30(S_1), 31,5(S_2), 32,5(M_3/M_4)
3	37,5 – 41,5	37,66(S_3), 39,17(M_2), 41,5(S_4),
4	42 – 46	42(S_1), 42,75(M_1), 43,5(S_2), 44,5(M_3/M_4)
5	49,5 – 53,5	49,66(S_3), 51,17(M_2), 53,5(S_4)
6	54 – 58	54(S_1), 54,75(M_1), 55,5(S_2), 56,5(M_3/M_4)
7	61,5 – 65,5	61,66(S_3), 63,17(M_2), 65,5(S_4)
8	66 – 70	66(S_1), 66,75(M_1), 67,5(S_2), 68,5(M_3/M_4)
9	73,5 – 77,5	73,66(S_3), 75,17(M_2), 77,5(S_4)
10	78 – 82	78(S_1), 78,75(M_1), 79,5(S_2), 80,5(M_3/M_4)
11	85,5 – 89,5	85,66(S_3), 87,17(M_2), 89,5(S_4)
12	90 – 94	90(S_1), 90,75(M_1), 91,5(S_2), 92,5(M_3/M_4)
13	97,5 – 101,5	97,66(S_3), 99,17(M_2), 101,5(S_4)
14	102 – 106	102(S_1), 102,75(M_1), 103,5(S_2), 104,5(M_3/M_4)
15	109,5 – 113,5	109,66(S_3), 111,17(M_2), 113,5(S_4)

16	114 – 118	114(S_1), 114,75(M_1), 115,5(S_2), 116,5(M_3/M_4)
17	121,5 – 125,5	121,66(S_3), 123,17(M_2), 125,5(S_4)
18	126 – 130	126(S_1), 126,75(M_1), 127,5(S_2), 128,5(M_3/M_4)
19	133,5 – 137,5	133,66(S_3), 135,17(M_2), 137,5(S_4)
20	138 – 142	138(S_1), 138,75(M_1), 139,5(S_2), 140,5(M_3/M_4)
21	145,5 – 149,5	145,66(S_3), 147,17(M_2), 149,5(S_4)
22	150 – 154	150(S_1), 150,75(M_1), 151,5(S_2), 152,5(M_3/M_4)
23	157,5 – 161,5	157,66(S_3), 159,17(M_2), 161,5(S_4)
24	162 – 166	162(S_1), 162,75(M_1), 163,5(S_2), 164,5(M_3/M_4)
25	169,5 – 173,5	169,66(S_3), 173,5(S_4)
26	174 – 178	174(S_1), 174,75(M_1), 175,5(S_2), 176,5(M_3/M_4)
27	181,5 – 185,5	181,66(S_3), 185,5(S_4)
28	186 – 190	186(S_1), 186,75(M_1), 187,5(S_2), 188,5(M_3/M_4)
29	193,5 – 197,5	193,66(S_3), 197,5(S_4)
30	198 – 202	198(S_1), 199,5(S_2)
31	205,5 – 209,5	205,66(S_3), 209,5(S_4)
32	210 – 214	210(S_1), 211,5(S_2)
33	221,5 – 225,5	221,5(S_4), 223,5(S_2)

34	233,5 – 237,5	233,5(S_4)
35	243,5 – 247,5	245,5(S_4)

Tabelle 1: Dargestellt sind Messintervalle von 4h mit der dazugehörigen, überdeckten Zeitspanne ab Eiablage und den eingeschlossenen Messzeitpunkten mit zugehöriger Versuchsnummer.

6.5 Datenaufbereitung und statistische Auswertung

Die graphische Aufarbeitung der zugrundeliegenden Daten wurde einerseits mit Microsoft Office 2013 (Microsoft® WORD2013, EXCEL2013 MSO 32-bit, Bestandteil von Microsoft Office 365ProPlus) und andererseits mit IBM® SPSS® Statistics Version 23 (IBM Corp ©copyright IBM corporation and its licensors 1989, 2015) realisiert.

Für die gesamten statistischen Analysen dieser Arbeit wurde ebenfalls SPSS® Version 23 verwendet. Diese umfassten Datenanalyse – und auswertung, beschreibende Statistik und statistische Auswertung, die Erstellung von Histogrammen, Boxplots, Graphen für geschätztes Randmittel, Testung der Stichproben auf Normalverteilung, ebenso multifaktorielle Varianzanalyse und verallgemeinertes lineares Modell, Signifikanzadjustierung und Testung von unabhängigen Stichproben mittels Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test.

7 Ergebnisse

7.1 Datenauswertung und deskriptive Statistik

Zu jedem Substrat wurden vier Versuchswiederholungen mit jeweils 400 Maden als Ausgangspunkt durchgeführt. Insgesamt standen damit für jedes Substrat potentiell 1600 Maden zur Verfügung. Im Verlauf der Experimente konnten jedoch nicht alle zugeteilten Maden wiedergewonnen werden. Für das Substrat Schwein konnten 855 Maden asserviert werden, und für das Substrat Mensch 1052 Maden. Von initial geplanten 20 Maden je Datenpunkt konnten über alle Versuchsdurchgänge betrachtet pro Substratbecher 1 bis 20 Maden asserviert werden.

Abweichungen von den pro Substratbecher geplanten 20 Maden beruhen darauf, dass nicht alle Larven innerhalb einer Suchdauer von 20 min gefunden werden konnten. Ebenso wurden alle Larven im Stadium der Präpuppe, Puppen und tote Maden von den Stichproben ausgeschlossen. Des Weiteren kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Maden sich auch gegenseitig aufgeessen haben. Im Falle von zu geringer Larvenzahlen der ersten Stichprobe wurde ein zusätzlicher Substratbecher entnommen, dies konnte zu Stichprobengrößen mit mehr als 20 Datenpunkten führen. Ebenfalls wurden bei dem definierten Endpunkt eines Versuchsdurchgangs alle verbleibenden Substratbecher entnommen und zu einem Messzeitpunkt zusammengefasst, was ebenfalls zu mehr als 20 Datenpunkten für diese Messzeitpunkte führen konnte.

Zunächst wurden alle Versuchsdurchgänge näher betrachtet, dabei sind die vermessenen Maden als Datenpunkte und die alle 12 h gelegenen Entnahmezeitpunkte als Messzeitpunkt benannt worden.

Tabelle 2 zeigt eine Übersicht über die Anzahl der Datenpunkte, Messzeitpunkte und Stichprobengrößen.

Übersicht der Substratversuche mit Schwein (S)

Versuchsnummer	Datenpunkte	Messzeitpunkte	Stichprobengröße
S_1	146	16	1 bis 21
S_2	212	17	5 bis 20
S_3	275	16	8 bis 20
S_4	222	20	7 bis 18

Tabelle 2: Übersichtstabelle für Versuche mit Schwein S_1 bis S_4 mit Datenpunkten, Messzeitpunkten und Stichprobengrößen

Auf die gleiche Weise ergeben sich für Substratversuche mit Menschenfleisch eins bis vier (M_1, M_2, M_3, M_4) folgende in Tabelle 3 zusammengefasste Werte. Dargestellt wird die Anzahl an Datenpunkten, Messzeitpunkten und Größe der Stichproben.

Übersicht der Substratversuche mit Mensch (M)

Versuchsnummer	Datenpunkte	Messzeitpunkte	Stichprobengröße
M_1	267	13	8 bis 20
M_2	254	13	12 bis 21
M_3	271	15	14 bis 20
M_4	260	15	5 bis 20

Tabelle 3: Übersichtstabelle für Versuche mit Mensch M_1 bis M_4 mit Datenpunkten, Messzeitpunkten und Stichprobengrößen

Nach der Auszählung und Vermessung der asservierten Schmeißfliegenlarven wurden zwei kritische Punkte in der Entwicklung betrachtet. Zuerst die Zeiten bis zu dem Auftreten der ersten Puppe, und zweitens der als Ende des Versuches definierte Zeitpunkt: „(...) wenn 50% der auffindbaren Larven in allen zum Versuch gehörenden Faunarien bereits verpuppt sind“. Aus den gemessenen Zeiten ließen sich für beide Zeitpunkte ADH-Summen ermitteln, die der Vergleichbarkeit mit Literaturdaten dienen. Als untere developmente temperature threshold (DTT) wurde dabei 0°C angenommen, da in der Literatur kein einheitlicher DTT bestimmt werden konnte.

Zunächst wurden die Zeitpunkte der ersten Puppe aller Versuchsdurchgänge grafisch in Form eines Balkendiagrammes und tabellarisch gegenübergestellt, zu sehen in Abbildung 6 und in Tabelle 4. Zusätzlich wurden in Tabelle 4 die zugehörigen ADH-Summen für alle Versuchsdurchgänge vermerkt.

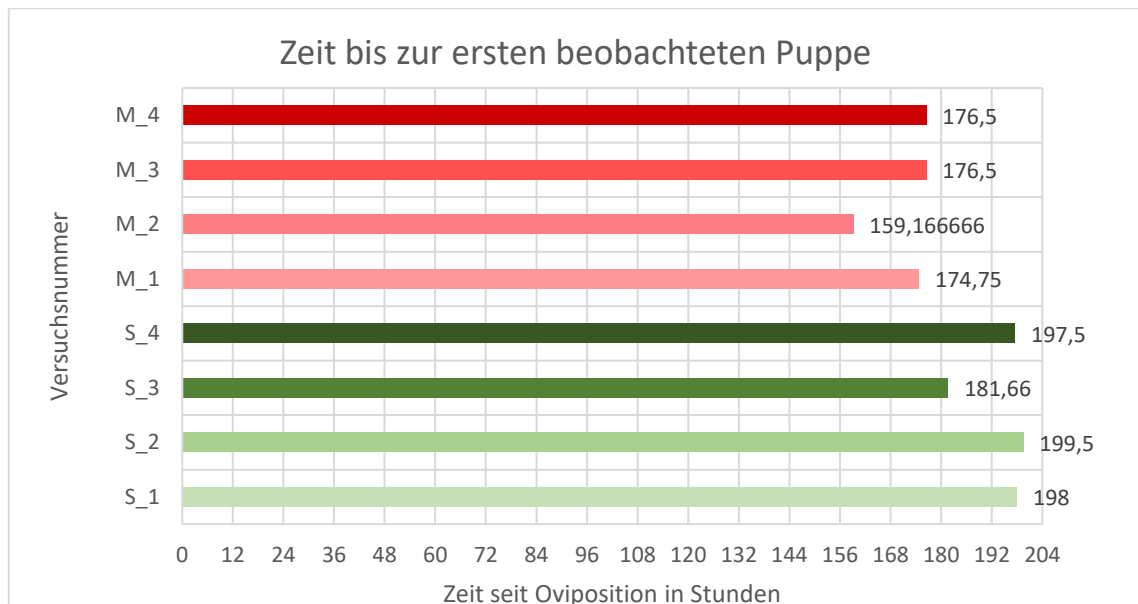


Abbildung 6: Balkendiagramm

Für die Vergleichbarkeit mit Daten aus der Literatur wurden die ADH-Summen für das definierte Ende eines Versuchsdurchganges und das Auftreten der ersten Puppe berechnet.

Verpuppungs- und Endzeitpunkte

Versuchsnummer	Erste Puppe / ADH (DTT=0°C)	50% Puppen / ADH
S_1	198 h / 4158	210 h / 4410
S_2	199,5 h / 4189,5	223 h / 4683
S_3	181,66 h / 3814,86	205,66 h / 4318,86
S_4	197,5 h / 4147,5	245,5 h / 5115,5
M_1	174,75 h / 3669,75	186,75 h / 3921,75
M_2	159,16 h / 3342,36	171,16 h / 3594,36
M_3	176,5 h / 3706,5	188,5 h / 3958,5
M_4	176,5 h / 3706,5	188,5 h / 3958,5

Tabelle 4: Zeiten in Stunden[h] bis zum Auftreten der ersten Puppe und bis 50% aller verbleibenden Larven verpuppt waren

Daraus lässt sich ablesen, dass in allen Versuchen mit humanem Substrat die Verpuppung früher stattfand. Die längste beobachtete Zeitspanne für humanes Substrat lag bei 176,5 h und war damit immer noch geringer als die kürzeste beobachtete Zeitspanne von 181,66 h für porkines Substrat.

Sowohl die Anzahl der überlebenden Maden, als auch die Zeiten bis zur Verpuppung decken sich mit den Beobachtungen während der Probenentnahmen, bei denen die Larven auf menschlichem Medium früher mit der Migration begannen, eine höhere Überlebensrate und früher ihre maximale Länge zu erreichen schienen. Die genaue statistische Beurteilung erfolgt im Kapitel 7.3.

Nach Betrachtung der Anzahl und der Zeitpunkte für die einzelnen Wiederholungen, wurden die größten und kleinsten Exemplare der jeweiligen Experimentaldurchgänge betrachtet. Dabei ergaben sich die für das Futtersubstrat Schwein in Tabelle 5 ermittelte Werte.

Minimale und maximale Madenlänge der Versuche mit porkinem Substrat

Versuchsnummer	Kleinstes Made [mm]	Größte Made [mm]
S_1	1,07	18,55
S_2	1,67	18,23
S_3	1,35	18,77
S_4	1,65	19,56

Tabelle 5: Minimale und maximale Madenlänge der Versuche mit porkinem Substrat

Für das menschliche Substrat ergaben sich die in Tabelle 6 dargestellte Werte:

Minimale und maximale Madenlänge der Versuche mit humanem Substrat

Versuchsnummer	Kleinstes Made [mm]	Größte Made [mm]
M_1	3,26	19,49
M_2	1,2	19,94
M_3	1,71	19,65
M_4	1,93	20,14

Tabelle 6: Minimale und maximale Madenlänge der Versuche mit humanem Substrat

Das größte Exemplar wurde auf menschlichen Substrat nachgewiesen und unterstützt ebenfalls die Beobachtung während der Durchführung, dass die Maden auf humanem Nährmedium größer schienen als auf porkinem.

Die erste grafische Beurteilung der Rohdaten erfolgte mittels Boxplot, wie in Abbildung 7 und 8 dargestellt, um Ausreißer und Extremwerte zu identifizieren. Ausreißer wurden mit einem Kreissymbol (°) und Extremwerte mit einem Sternsymbol (*) markiert. Als Ausreißer sind alle Datenpunkte gewertet worden, die zwischen dem anderthalbfachen und dem dreifachen der Boxhöhe entweder oberhalb der 75%-Perzentile oder unterhalb der 25%-Perzentile liegen, dabei ist die Boxhöhe als Abstand zwischen 25%- und 75%-Perzentile definiert. Extremwerte haben einen Abstand zu den Perzentilen von mehr als der dreifachen Boxhöhe.

Daraus ergaben sich für alle Versuche mit Schwein 26 Ausreißer und 21 Extremwerte, für alle Versuche mit Mensch 31 Ausreißer und 12 Extremwerte. In Tabelle 7 wurden für alle Wiederholungen des Experiments die Ausreißer und Extremwerte nach Versuchsnummer aufgeschlüsselt.

Ausreißer und Extremwerte

Versuchsnummer	Ausreißer (Anzahl) °	Extremwerte (Anzahl) *
S_1	6	5
S_2	3	4
S_3	8	9
S_4	9	3
Schwein gesamt	26	21
M_1	4	3
M_2	14	5
M_3	6	1
M_4	7	3
Mensch gesamt	31	12

Tabelle 7: Ausreißer und Extremwerte.

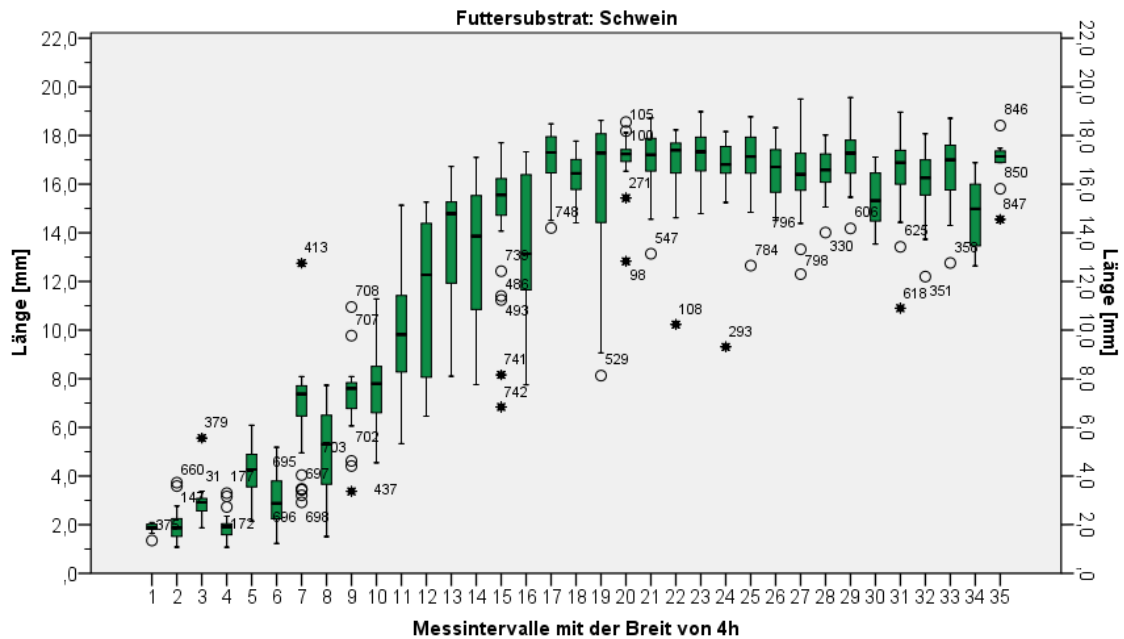


Abbildung 7: Boxplot der Rohdaten mit Markierungen der „ ° “ = Ausreißer, „ * “ = Extremwerte jeweils mit Verweis auf Nummerierung in SPSS® für Substrat: Schwein.

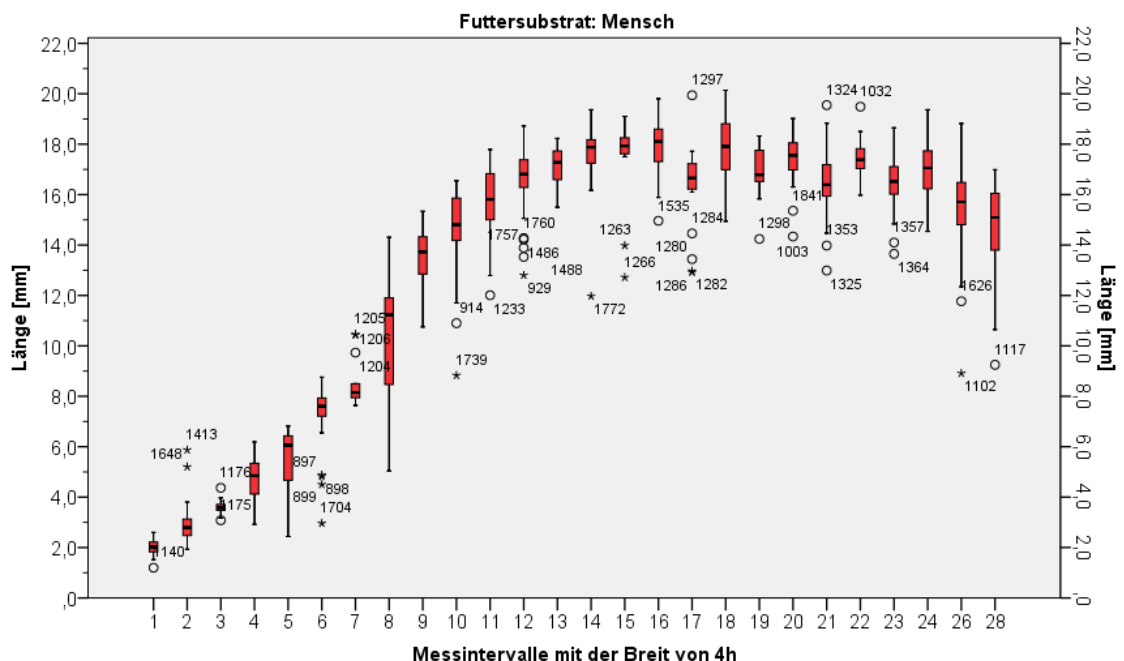


Abbildung 8: Boxplot der Rohdaten mit Markierungen der „ ° “ = Ausreißer, „ * “ = Extremwerte jeweils mit Verweis auf Nummerierung in SPSS® für Substrat: Mensch

Bei der Betrachtung der Boxplotdarstellung in Abbildung 7 und 8 lassen sich bereits Unterschiede in der Verteilung und der Streuung der erhobenen Messwerte ablesen. So wirkt die grafische Darstellung für menschliches Substrat homogener und der Anstieg der Kurve steiler als für das Substrat vom

Schwein. In der Zeitachse (y-Achse) kann man weiterhin ablesen, dass für die Versuche mit Schwein 35 Messintervalle von 4 h abgetragen wurden, um alle Datenpunkte einschließen zu können. Dagegen nur 28 Messintervalle um alle Datenpunkte für menschliches Nährmedium einzuschließen.

Danach folgte die Erstellung von Übersichtskurven aus den Rohdaten für die einzelnen Versuchsdurchgänge, sowie eines Graphen zum Vergleich der Mittelwerte der Versuchswiederholungen. Auf der x-Achse wurde für alle Graphen die Zeit seit Oviposition in Stunden aufgetragen, auf die y-Achse entsprechend die Länge in mm. Für jeden Versuchsdurchgang wurde in den Abbildungen 9 bis 16 eine eigene Grafik angefertigt. Dabei wurde für jeden Graphen dasselbe Farbschema verwendet, um Median, Mittelwert, minimale und maximale Länge darzustellen. In Abbildung 17 werden die Mittelwerte aller Wiederholungen farblich aufgeteilt nach Substrattyp gegenübergestellt, Rottöne für humanes und Grüntöne für porkines Nährmedium.

Gut zu erkennen ist, dass für alle Experimentdurchläufe in den Abbildungen 9 bis 16 die Mittel- und Medianwerte dicht beieinander liegen. Unterschiede in den verwendeten Substraten lassen sich bereits in der grafischen Darstellung erkennen. Die Kurven für porkines Substrat weisen einen flacheren Anstieg und eine längere Plateauphase als die entsprechenden Kurven für humanes Substrat auf. Weiterhin sind Unterschiede in den Endzeitpunkten, den Zeitpunkten des Erreichens der maximalen Länge und der maximalen Größen deutlich abzulesen.

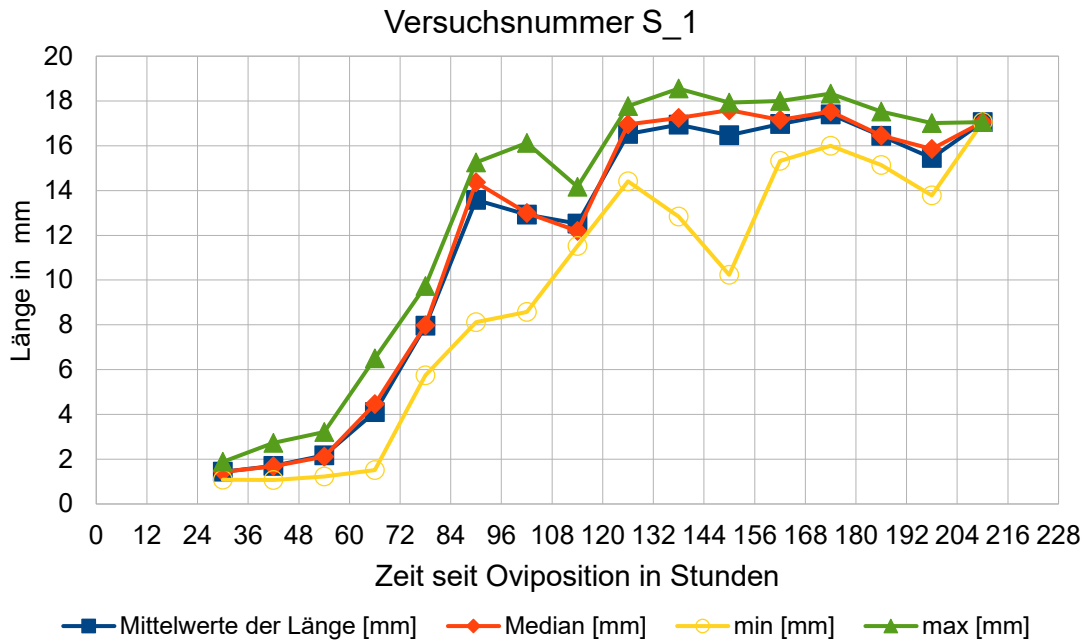


Abbildung 9: Gemessene Mittelwerte Madenlängen des Versuchsdurchganges S_1

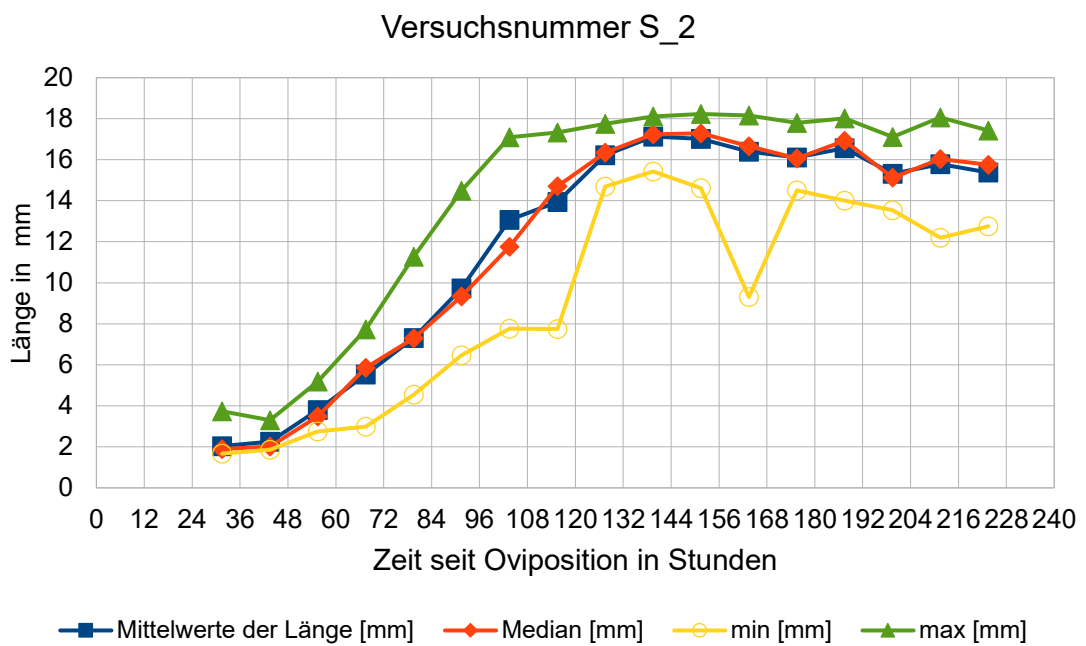


Abbildung 10: Gemessene Mittelwerte Madenlängen des Versuchsdurchganges S_2

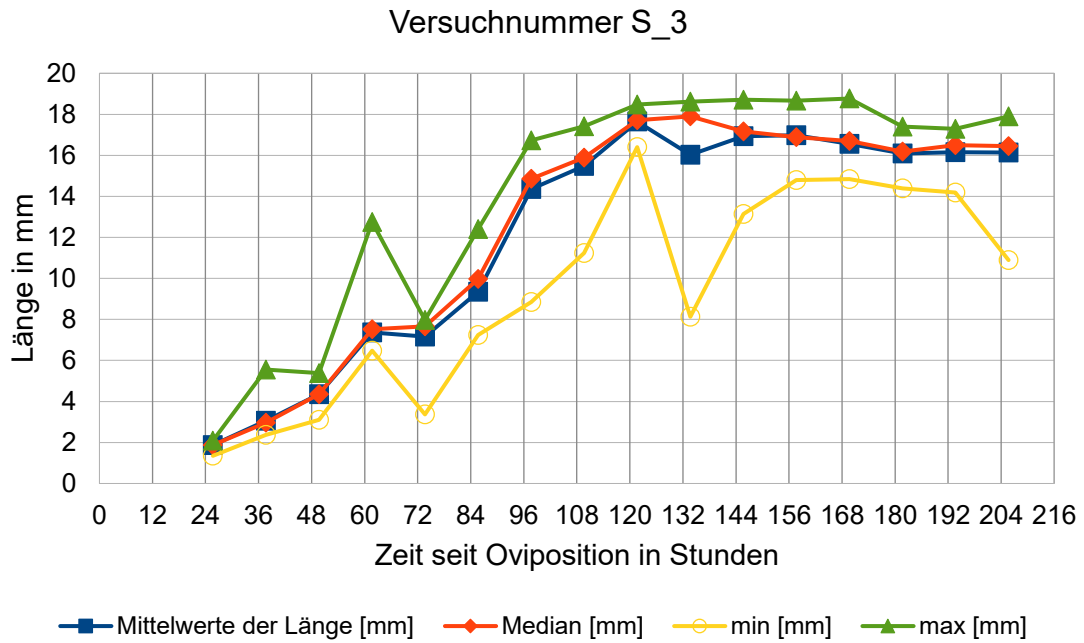


Abbildung 11: Gemessene Mittelwerte Madenlängen des Versuchsdurchganges S_3

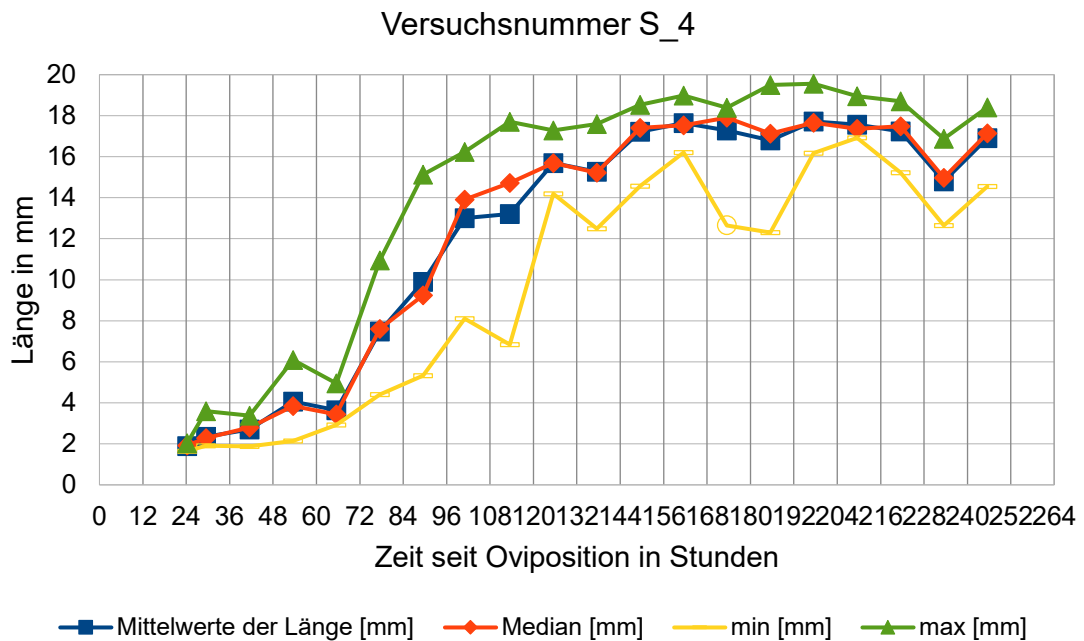


Abbildung 12: Gemessene Mittelwerte Madenlängen des Versuchsdurchganges S_4

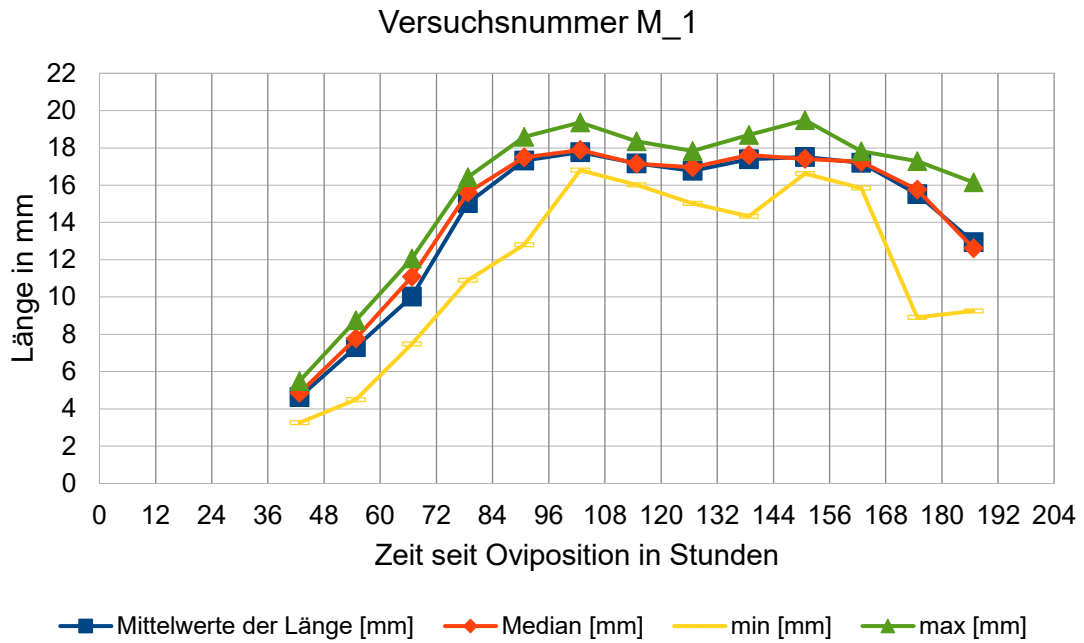


Abbildung 13: Gemessene Mittelwerte Madenlängen des Versuchsdurchganges M_1

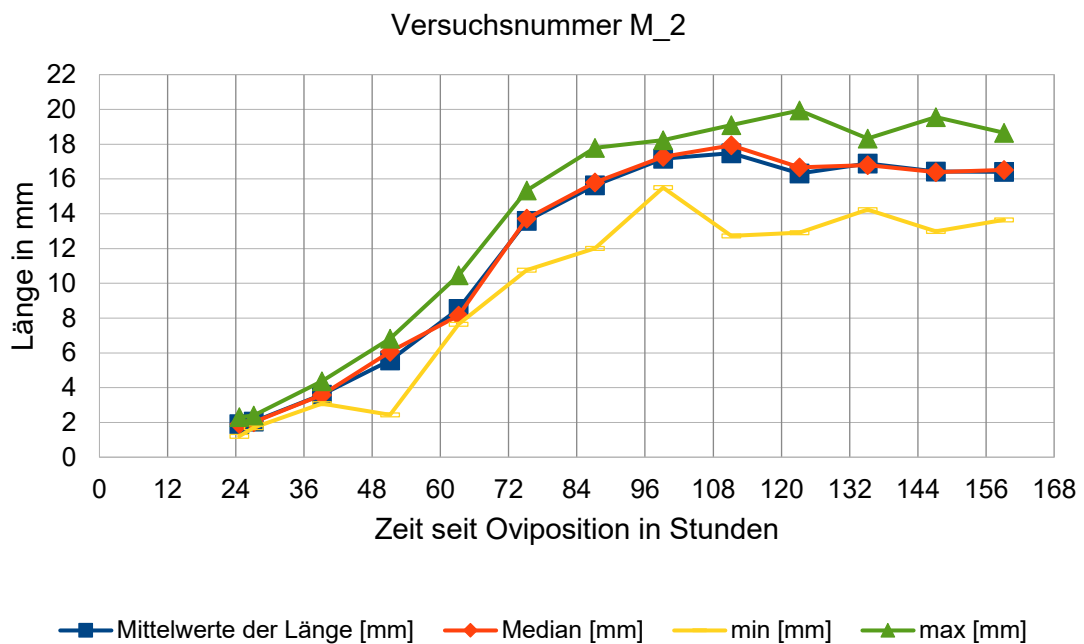


Abbildung 14: Gemessene Mittelwerte Madenlängen des Versuchsdurchganges M_2

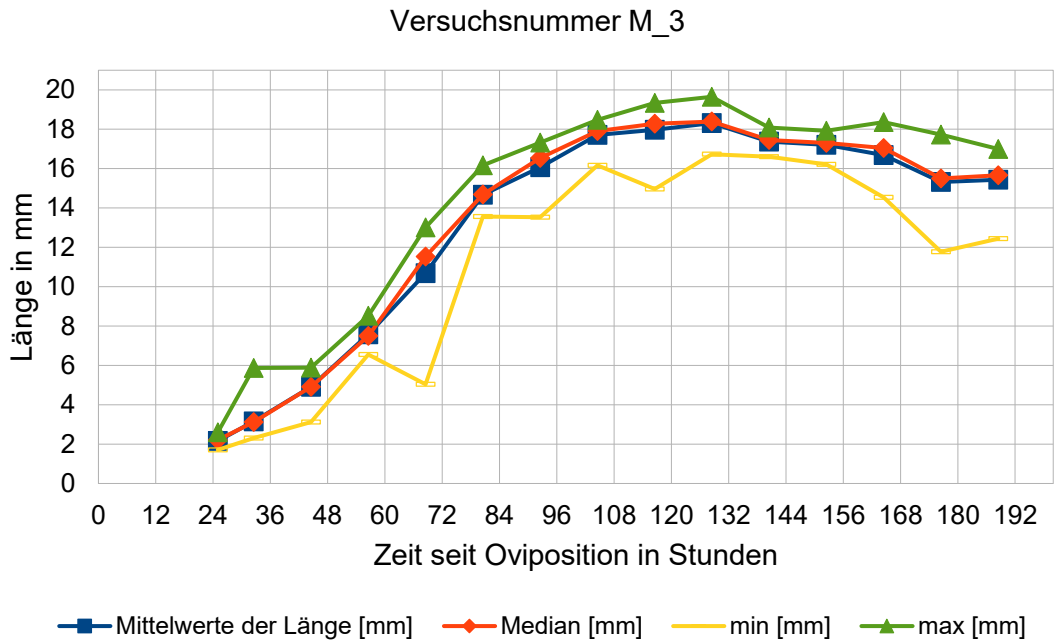


Abbildung 15: Gemessene Mittelwerte Madenlängen des Versuchsdurchganges M_3

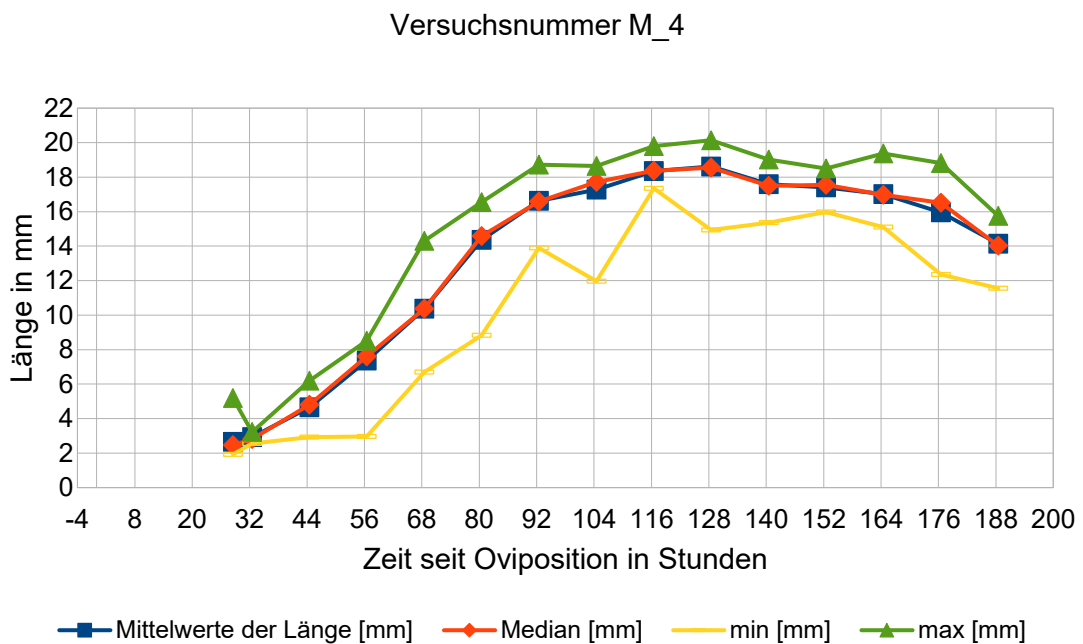


Abbildung 16: Gemessene Mittelwerte Madenlängen des Versuchsdurchganges M_4

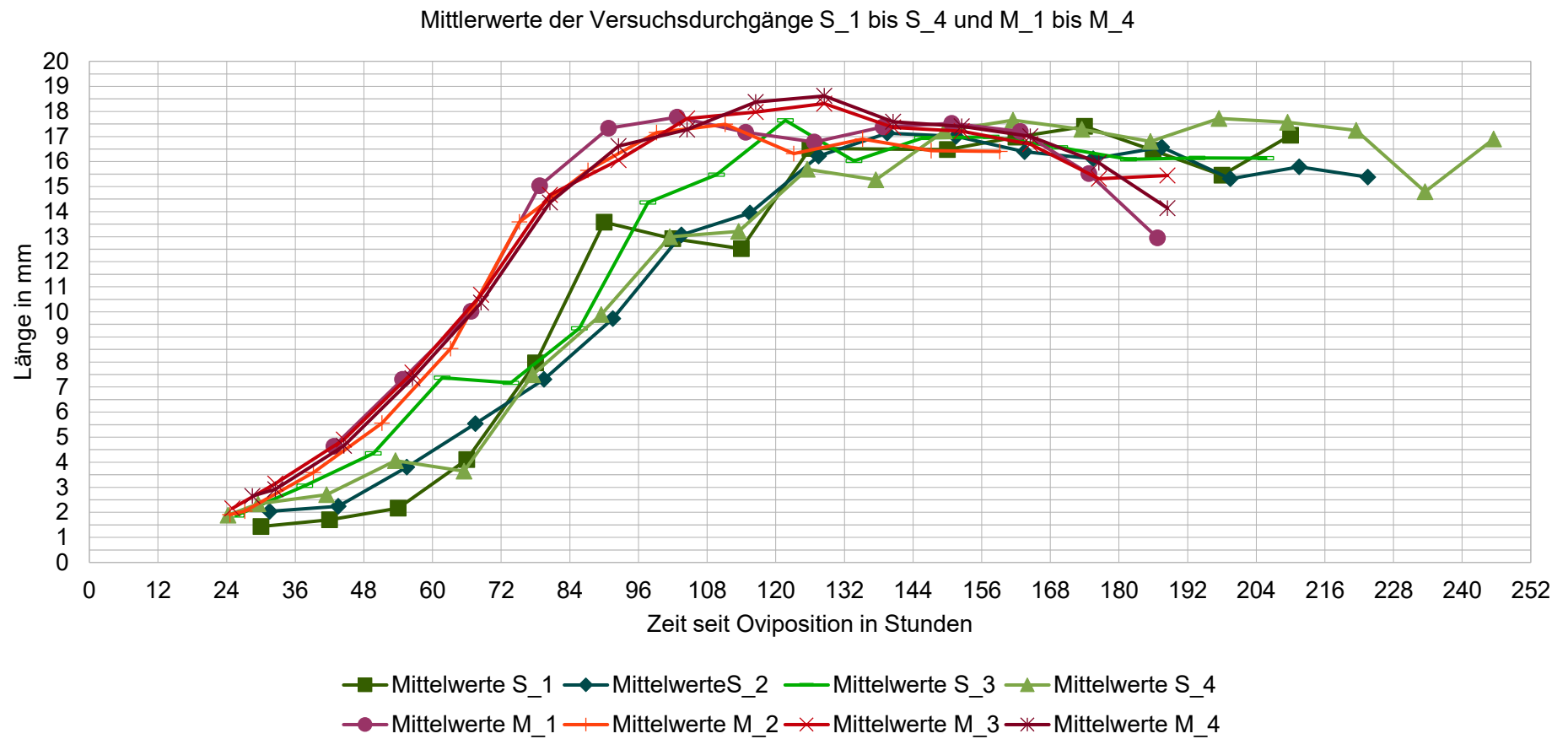


Abbildung 17: Graph der Mittelwerte aller Experimentaldurchgänge

In der Abbildung 17 lassen sich im grafischen Vergleich der Mittelwerte weitere Divergenzen ablesen, zu denen der steilere Anstieg und das homogenere Kurvenverhalten der Versuchsreihe mit humanem Substrat zählen. Es ist zu erkennen, dass die roten Kurven (humanes Substrat) homogener und dichter gruppiert verlaufen, als die grünen Kurven (Substrat vom Schwein). Ebenso ist der Anstieg steiler und das Maximum der Länge wird früher erreicht. Ein deutlicher Abfall der Kurve zum Ende der Versuche hin ist ebenfalls festzustellen. Wohingegen bei den grünen Kurven größere Schwankungen und ein inhomogenerer Verlauf zu beobachten sind und sich nach Erreichen der maximalen Länge eine Plateauphase mit einer leicht abfallenden Tendenz anschließt.

7.2 Filterung und Datenaufbereitung

Bevor die Rohdaten für die Beantwortung der Kernfrage dieser Dissertation weiter analysiert werden konnten, mussten sie aufgrund der Abweichungen der Abstände zwischen definiertem Nullpunkt und dem ersten Messzeitpunkt festen Messintervallen zugeordnet werden. Die Zuordnung der einzelnen Versuchsdurchgänge wurde bereits in Kapitel 6.3 genauer erläutert. Dies war nötig, um die Einflüsse der Substrate auf das Wachstumsverhalten der Fliegenlarven statistisch valide auswerten zu können.

In bereits veröffentlichten Studien wurde zum Wachstumsverhalten forensisch relevanter Fliegenarten beobachtet, dass ein Teil der Larven ein signifikant verzögertes Wachstumsverhalten aufweist und somit einen relevanten Einfluss auf die statistische Auswertung der gewonnen Daten hat (Hwang und Turner 2009). Diese sogenannten Laggards benötigen eine höhere ADD/ADH-Summe um gleiche Entwicklungsabschnitte zu erreichen als die übrige Population unter vergleichbaren Umweltbedingungen.

In der forensischen Praxis ist es Usus, nur die größten und somit ältesten Larven für die Bestimmung des PMI_{min} heranzuziehen, um eine Verfälschung durch Maden späterer Gelege auszuschließen. Dieses Vorgehen ist darin begründet, dass man davon ausgeht, dass die ersten Gelege auf einem Leichnam zum Zeitpunkt der Asservation auch gleichzeitig die am weitesten entwickelten sind. Hinzu kommt, dass für die Bestimmung des Entwicklungsfortschrittes in der Regel das Längenwachstum der Maden beurteilt und mit Daten aus der Literatur verglichen wird (Niederegger et al. 2013, Arnaldos et al. 2005, Baque und Amendt 2013, Amendt et al. 2007). So ist eine Möglichkeit die 10 größten Larven je Messzeitpunkt zu betrachten, was aufgrund der vorliegenden Stichprobengrößen mit teilweise weniger als 10 Exemplaren nicht möglich ist. Aus diesem Grund und den oben erwähnten Laggards wurden nur die Exemplare in die Betrachtung mit einbezogen, die größer als das unterste Quartil eines jeden individuellen Messzeitpunktes waren.

Durch diese Festsetzung werden 238 Datenpunkte für porkines Substrat und 289 Datenpunkte für humanes Substrat als potentielle Laggards deklariert. Weiterhin werden für Schwein 47 und für Mensch 43, die mittels Boxplot identifizierten Ausreißer und Extremwerte mit Hilfe einer Filtervariablen, von der weiteren Auswertung ausgeschlossen, um einen verzerrenden Effekt zu vermeiden. Daraus ergeben sich für die statistische Analyse entsprechend der forensischen Praxis nutzbar für Schwein 570 von 855 Datenpunkte und für Mensch 720 von 1052 Datenpunkte, was 1290 von initial 1907 Datenpunkten entspricht. Da dies für porkines Substrat die nutzbaren Datenpunkte auf 66,67% und für humanes Substrat auf 68,44% reduziert, wird in Kapitel 7.4 die statistische Auswertung für die Datensätze einmal inklusive und einmal exklusive der potentiellen Laggards vorgenommen. Die Ergebnisse werden bezüglich ihrer Unterschiede untersucht und gegenübergestellt. Im Folgenden wird der Datensatz für humanes und porkines Substrat, der nur um die Ausreißer und Extremwerte bereinigt wurde, „Datensatz1“ und der Datensatz, der sowohl um Ausreißer und Extremwerte, als auch um die potentiellen Laggards bereinigt wurde, „Datensatz2“ genannt.

Von den insgesamt 35 zugeordneten Messintervallen konnten 9 nicht mit in die Betrachtung einbezogen werden. Ein paarweiser Vergleich beider Substrate für die ausgeschlossenen Messintervalle war nicht möglich, da von den notwendigen Datenpunkten für beide Substrate nur Datenpunkte für eines der beiden Substrate vorlagen.

7.3 Statistische Auswertung und Testung

Als erstes wurden die Unterschiede der Zeiten bis zum Auftreten der ersten Puppe und bis zum definierten Endpunkt einer Versuchswiederholung, auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht. Für die Testung der beiden unabhängigen Stichproben wurde der parameterfreie Test nach Wilcoxon-Mann-Whitney-U gewählt, da dieser Test ohne eine Verteilungsvoraussetzung der Grundgesamtheit für die zu testende Stichprobe valide Ergebnisse liefert. Für den Zeitpunkt der ersten Puppe konnte der Einfluss des Substrates als signifikant beurteilt werden (exakte Signifikanz (zweiseitig) $p=0,029$). Für den definierten Endpunkt jedes Versuchsdurchgangs konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied in Abhängigkeit von dem Futtersubstrat ermittelt werden (exakte Signifikanz (zweiseitig) $p=0,029$).

Anschließend wurde die Anzahl der bewertbaren Larven auf die gleiche Weise mittels des Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test auf substratspezifische Unterschiede untersucht, es konnte jedoch keine signifikante Abhängigkeit von dem Futtersubstrat zur Anzahl der Maden festgestellt werden (exakte Signifikanz (zweiseitig) $p=0,343$).

Nachfolgend wurden die kleinsten und größten beobachteten Larvenlängen je Versuch auf substratabhängige Einflüsse hin betrachtet. Für die maximale Länge trat ein Grenzfall auf, da die asymptotische Signifikanz (zweiseitig getestet) $<0,05$ ($p=0,043$), die exakte Signifikanz (zweiseitig getestet) jedoch $>0,05$ ($p=0,057$) war, sodass eine definitive Aussage in diesem Fall nicht

getroffen werden kann. Für die minimale Larvenlänge dagegen konnte ein statistisch signifikanter Substrateinfluss abgelehnt werden (exakte Signifikanz (zweiseitig) $p > 0,200$).

Für die Datenanalyse mittels multifaktorieller Varianzanalyse (analysis of variances = ANOVA) und verallgemeinertem linearem Modell, müssen aufgrund der Struktur der Rohdaten Vorüberlegungen angestellt werden.

Die Grundgesamtheit aller Daten kann nach den zentralen Grenzwertsätzen als normalverteilt angenommen werden, da die kleinen Abweichungen zwischen den Stichproben keine verfälschenden Auswirkungen auf die Analyse haben. Dies kann insbesondere angenommen werden, da in bisher veröffentlichten Studien für *Calliphora vicina* bei der Erstellung von Wachstumskurven eine Analyse mittels ANOVA möglich war, und eine Normalverteilung unter vergleichbaren Bedingungen vorgelegen hat (Niederegger et al. 2013, Hwang und Turner 2009, Kaneshrajah und Turner 2004, Richards et al. 2013b). Somit ist davon auszugehen, dass im vorliegenden Fall die Abweichungen einzelner Stichproben (Messzeitpunkte) von der Normalverteilung als zufällig bewertet werden können.

Das zusätzlich auftretende Problem der Varianzheterogenität, nachgewiesen durch einen signifikanten Test nach Levene ($p < 0,0001$), kann durch eine Anpassung des Signifikanzniveaus unter Verwendung eines Varianzschätzers und des verallgemeinerten linearen Modells ausgeglichen werden. Die Varianzheterogenität mit einem signifikanten Test nach Levene trat für beide Datensätze („Datensatz1“ und „Datensatz2“) in gleichem Maße auf. Die angewendete Bonferroni-Korrektur für das Signifikanzniveau konnte für beide Datensätze identisch ausgeführt werden, da sich die Datensätze nur in der Anzahl der eingeschlossenen Datenpunkte, aber nicht in der Anzahl der Messintervalle unterscheiden. Demnach erfolgt zuerst die Anpassung des Signifikanzniveaus, die vorsieht das übliche Signifikanzniveau von 0,05 durch die Anzahl der ausgeführten Tests zu dividieren. Auf den hier vorliegenden Fall angewendet muss 0,05 durch die Anzahl der Messintervalle dividiert werden, die in der Analyse eingeschlossen werden. Dies erfüllen 26 von 35 Messintervalle, woraus sich ein neues Signifikanzniveau für die Analyse mittels

ANOVA und verallgemeinertem linearen Modell von $0,05/26=0,0019$ ergibt, was einem Konfidenzintervall von 99,81% entspricht.

Zunächst erfolgte die Beurteilung grafisch für die geschätzten Randmittel der eingeschlossenen Daten. In den Abbildungen 18 und 19 lässt sich gut erkennen, dass die erste Hälfte der Längenentwicklung unterschiedlich auf humanem und porkinem Futtersubstrat verläuft. Dabei sind die Graphen für beide Datensätze nahezu identisch, nur in den exakten Werten für den Schätzer der Mittelwerte, aus den die Graphen erstellt werden lässt sich ablesen, dass diese Werte für „Datensatz1“ für alle Messintervalle geringfügig kleiner sind als für „Datensatz2“.

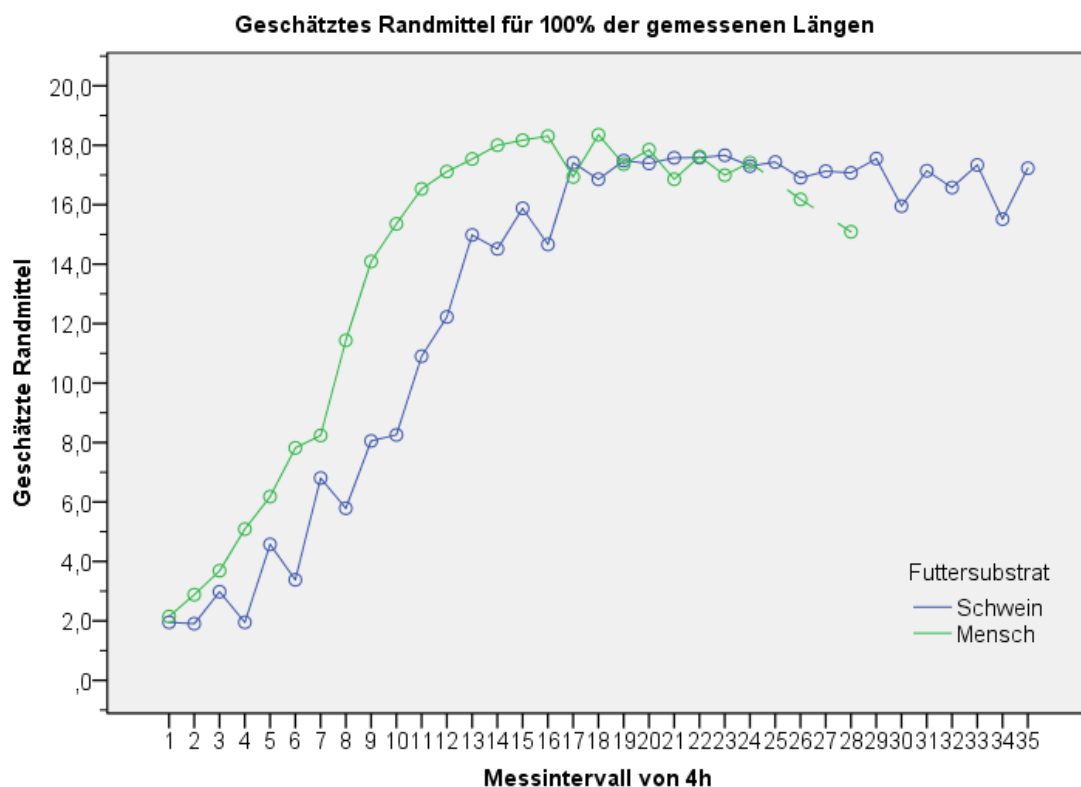


Abbildung 18: Graph zum geschätzten Randmittel für „Datensatz1“ mit Konfidenzintervall von 99,81%.

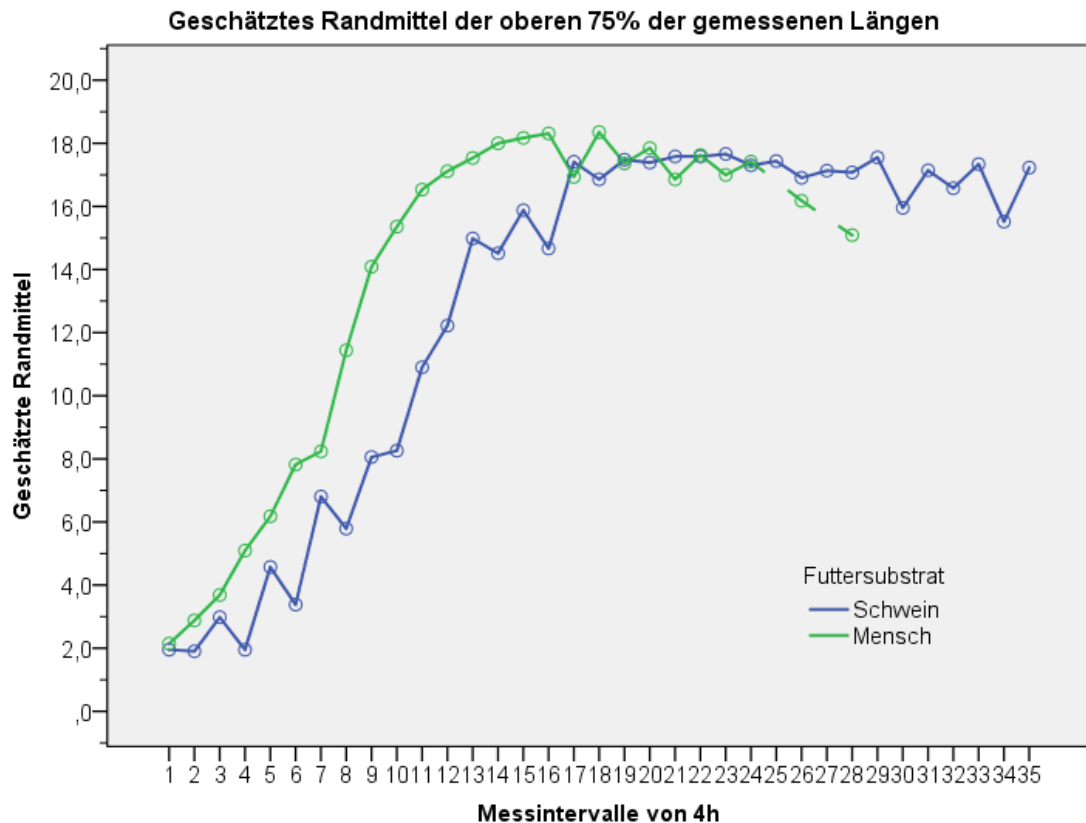


Abbildung 19: Graph zum geschätzten Randmittel für „Datensatz2“ mit Konfidenzintervall von 99,81%.

Das Längenwachstum auf menschlichem Substrat ist deutlich schneller und der aufsteigende Kurvenabschnitt entspricht eher einem sigmoidalem Verlauf. Dagegen ähnelt der aufsteigende Kurvenabschnitt für porkines Nährmedium eher exponentiellen Kurven bzw. linearem Verhalten. Ein weiterer Unterschied ist die im Vergleich zu menschlichem Substrat verlängerte Plateauphase und ein insgesamt geringerer Abfall nach Erreichen der maximalen Madenlänge.

Die Aussage der ausgeführten Vortestung mittels eines Omnibus-Tests (Wald-Chi-Quadrat) für beide Datensätze ist, dass es sich jeweils um zwei signifikant unterschiedliche Gruppen handelt ($p < 0,0001$). Auch die Testung von Einflüssen der einzelnen Faktoren ergab für beide Datensätze einen signifikanten Einfluss des Substrates ($p < 0,0001$) und einen signifikanten Einfluss von Substrat in Verbindung mit Messintervall ($p < 0,0001$).

In Tabelle 8 und 9 werden jeweils die Messintervalle mit dazugehörigen Wald-Chi-Quadrat und Signifikanzen dargestellt. In Tabelle 10 erfolgt die

Gegenüberstellung der Signifikanzen aus „Datensatz1“ und „Datensatz2“. In zuvor genannten Tabellen werden die Messintervalle ohne signifikanten Unterschied der Substrate farblich (grau hinterlegt) hervorgehoben.

Messintervall	Wald-Chi-Quadrat	Signifikanz
1	15,670	< 0,0001
2	159,358	< 0,0001
3	88,084	< 0,0001
4	574,840	< 0,0001
5	18,842	< 0,0001
6	424,800	< 0,0001
7	21,636	< 0,0001
8	147,345	< 0,0001
9	235,896	< 0,0001
10	370,549	< 0,0001
11	128,666	< 0,0001
12	48,539	< 0,0001
13	42,010	< 0,0001
14	45,829	< 0,0001
15	36,309	< 0,0001
16	41,605	< 0,0001
17	1,581	0,209
18	27,657	< 0,0001
19	1,502	0,220
20	5,471	0,019
21	9,152	0,002
22	0,965	0,326
23	7,208	0,007
24	0,129	0,720
26	11,718	0,001
28	27,048	< 0,0001

Tabelle 8: Ergebnisse des linear unabhängigen paarweisen Vergleichs für „Datensatz1“ je Messintervall zwischen den geschätzten Randmittel mit einem Signifikanzniveau von 99,81%.

Messintervall	Wald-Chi-Quadrat	Signifikanz
1	34,329	< 0,0001
2	151,392	< 0,0001
3	151,189	< 0,0001
4	971,443	< 0,0001
5	73,445	< 0,0001

6	326,510	< 0,0001
7	13,643	< 0,0001
8	279,630	< 0,0001
9	419,473	< 0,0001
10	536,093	< 0,0001
11	189,835	< 0,0001
12	46,677	< 0,0001
13	93,875	< 0,0001
14	49,617	< 0,0001
15	72,987	< 0,0001
16	37,773	< 0,0001
17	3,586	0,058
18	37,063	< 0,0001
19	,116	0,734
20	12,718	< 0,0001
21	14,810	< 0,0001
22	,134	0,714
23	8,097	0,004
24	,372	0,542
26	10,434	0,001
28	31,053	< 0,0001

Tabelle 9: Ergebnisse des linear unabhängigen paarweisen Vergleichs für „Datensatz2“ je Messintervall zwischen den geschätzten Randmittel mit einem Signifikanzniveau von 99,81%.

Gesamttestergebnis „Datensatz1“ + „Datensatz2“

Messintervall	Signifikanz „Datensatz1“	Signifikanz „Datensatz2“
1	< 0,0001	< 0,0001
2	< 0,0001	< 0,0001
3	< 0,0001	< 0,0001
4	< 0,0001	< 0,0001
5	< 0,0001	< 0,0001
6	< 0,0001	< 0,0001
7	< 0,0001	< 0,0001
8	< 0,0001	< 0,0001
9	< 0,0001	< 0,0001
10	< 0,0001	< 0,0001
11	< 0,0001	< 0,0001
12	< 0,0001	< 0,0001
13	< 0,0001	< 0,0001
14	< 0,0001	< 0,0001
15	< 0,0001	< 0,0001
16	< 0,0001	< 0,0001
17	0,209	0,058
18	< 0,0001	< 0,0001

19	0,220	0,734
20	0,019	< 0,0001
21	0,002	< 0,0001
22	0,326	0,714
23	0,007	0,004
24	0,720	0,542
26	0,001	0,001
28	< 0,0001	< 0,0001

Tabelle 10: Gegenüberstellung Signifikanzen der Datensätze „Datensatz1“ und „Datensatz2“ je Messintervall mit einem Signifikanzniveau von 99,81%.

Als abschließendes Ergebnis des verallgemeinerten linearen Modells lassen sich für den „Datensatz1“ bei 19 von 26 Messintervallen und für den „Datensatz2“ bei 21 von 26 Messintervallen signifikante Unterschiede feststellen ($p < 0,001$). Unterschiede für die Datensätze sind für die Messintervalle 20 und 21 festzustellen, die bei Betrachtung der Daten inklusive der potentiellen Laggards keinen signifikanten Unterschied (Signifikanz 0,019 und 0,002) zwischen den Substraten feststellen lassen. Betrachtet man jedoch die Larvenlänge ohne potentielle Laggards, so kann ein signifikanter Unterschied für die Substrate festgestellt werden (Signifikanz je $< 0,0001$). Ebenso kann abgelesen werden, dass wenn keine Signifikanz für ein Messintervall vorliegt, die Abweichungen für „Datensatz1“ höher ausfallen und ein substratspezifischer Unterschied noch unwahrscheinlicher ist als es für „Datensatz2“ der Fall ist.

Bis zum Erreichen der maximalen Länge (Intervall 16) verlaufen beide Kurven klar getrennt, und es lassen mit statistischen Methoden signifikante Unterschiede herausstellen. Danach beginnen beide Kurven abzufallen, was dem zweiten Abschnitt des dritten Larvenstadiums (3te Instar) entspricht, jedoch doch nicht in gleichem Maße, sondern die Kurve für humanes Substrat fällt steiler und schneller. In diesem Bereich kreuzen sich beide Kurven und eine Aussage zu Unterschieden ist mit statistischen Methoden für die Betrachtung der Larvenlänge nicht mehr klar zu treffen.

Für die Messintervalle 17, 19, 20, 21, 22, 23 und 24 des „Datensatz1“ konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p=0,209$, $p=0,220$, $p=0,019$, $p=0,002$, $p=0,326$, $p=0,007$ und $p=0,720$). Ebenfalls konnte für die

Messintervalle 17, 19, 22, 23 und 24 des „Datensatz2“ kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p=0,058$, $p=0,734$, $p=0,741$, $p=0,004$ und $p=0,542$).

Die Messintervalle 29 bis 35 in Abbildung 18 ergeben einen plateauartigen Verlauf der Kurve für das Substrat Schwein. Im Gegensatz dazu ist der Kurvenabfall nach Erreichen des Peaks bei humanem Substrat ausgeprägter und schneller.

Ein analoges Kurvenverhalten ist in der Abbildung 17 (Kapitel 7.1) auf dem Graphen aller Mittelwerte zu beobachten.

8 Diskussion

Für jeden forensischen Entomologen ist es unabdingbar, sich der verwendeten Futtersubstrate für Vergleichsdaten bewusst zu sein und deren Einfluss auf die PMI_{min}-Bestimmung mit einzukalkulieren, besonders da die Übertragbarkeit von Erkenntnissen für eine forensisch relevante Spezies nicht ohne weiteres oder gar nicht auf eine andere Spezies übertragbar sind. Ein menschlicher Leichnam und dessen Verwertung ist ein derart komplexes ökologisches System, das in Laborexperimenten unmöglich in seiner Gänze abgebildet und nachgestellt werden kann.

Die Entwicklung vom Ei bis zur adulten Schmeißfliege ist ein biologischer Prozess mit multiplen Einflussfaktoren, die sich untereinander in unterschiedlichem Maße beeinflussen können. Unter anderem die intrinsisch erzeugte Temperatur (Ireland und Turner 2006, Slone und Gruner 2007, Charabidze et al. 2011, Johnson und Wallman 2014) und extrinsische temperaturmodulierende Einflüsse (Ames und Turner 2003, Hwang und Turner 2009, Adair 2008, Fremdt und Amendt 2014, Matuszewski et al. 2008, Niederegger et al. 2010), sowie von leichenspezifischen Faktoren (Day und Wallman 2008, Matuszewski et al. 2016) und Umgebungsvariablen (Anderson 2011, Matuszewski et al. 2008, Hwang und Turner 2009, Baz et al. 2015). Alle Faktoren haben schlussendlich auch Einfluss auf das geschätzte PMI_{min} und somit auf die Aussagen der forensischen Entomologie in medico-legalen Zusammenhängen.

Die meisten älteren Arbeiten haben sich bei der Untersuchung der Einflussfaktoren mehrheitlich darauf verlassen, dass der Einfluss des verwendeten Futtersubstrates keinen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung der untersuchten Fliegenarten hätte, jedoch haben Untersuchungen der jüngeren Vergangenheit Zweifel an dieser Annahme aufkommen lassen (Niederegger et al. 2013, Clark et al. 2006, Day und Wallman 2006b, Kaneshrajah und Turner 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurde der geäußerten Kritik an fehlendem Vergleich zu menschlichem Substrat, mit daraus resultierenden Über- bzw. Unterschätzung der PMI_{min} (Arnaldos et al. 2005), nachgegangen. Es hat sich gezeigt, dass die Entwicklung von *C. vicina* auf menschlichem Substrat im Vergleich zu prokinem Substrat nicht nur homogener, sondern auch signifikant schneller vollzogen wird. So wird die Verpuppung bis zu 24h eher beobachtet, ebenso das Erreichen der maximalen Larvenlänge. Der Vergleich mit der Literatur zeigt hier, dass je nach Experiment, Aufbau und Wahl des Futtersubstrates Unterschiede zu den gewonnenen Ergebnissen vorliegen. So beobachteten Niederegger et al. (2013) die ersten Puppen von *C. vicina* auf tierischen Substraten mehrheitlich am 8. Tag und in einem Fall am 7. Tag nach Eiablage, was sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit für porkines Substrat deckt. Die Unterschiede beschränken sich nicht nur auf das Erreichen der Zeit bis zur Verpuppung, ebenso ließ sich nachweisen, dass es einen signifikanten Unterschied in der Wachstumsgeschwindigkeit und Längenzunahme in den ersten 5 Tagen nach Schlüpfen der Maden zwischen humanem und porkinem Futtersubstrat gibt. In der Literatur gibt es unterdes gegenläufige Aussagen zu dem Einfluss der Spenderspezies auf das Wachstumsverhalten von *C. vicina*. So sehen Niederegger et al. (2013) in der Aufbereitung und Gewebeart eine beeinflussende Größe und schließen die Spenderspezies als Faktor aus, dagegen führen Clark et al. (2006) sowohl Gewebeart, Aufbereitung und Spenderspezies als signifikante Einflussfaktoren an. Unter Betrachtung der Ergebnisse hat dies einen gravierenden Einfluss auf die PMI_{min}-Bestimmung, da zu der Ermittlung in tatsächlichen Fällen immer die ältesten Individuen betrachtet werden. Dies kann aufgrund der Ergebnisse im vorliegenden Fall zu einer Überschätzung des PMI_{min} um fast 24 h führen.

Mit bisherigen Ergebnissen deckt sich, dass nach 24 h auf allen Ovipositionsmedien geschlüpfte Maden nachgewiesen werden konnten (Niederegger et al. 2013, Donovan et al. 2006).

Der Vergleich der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit mit ADH-/ADD-Summen beziehungsweise Isomegalen aus bestehender Literatur erwies sich als impraktikabel, da die bestehende Datenlage zum einen uneinheitlich und zum

anderen mit großen Abweichungen untereinander versehen ist, insbesondere was die angenommene untere DTT betrifft (Roe und Higley 2015, Richards und Villet 2009, Richards und Villet 2008). Des Weiteren konnte in der vorliegenden Arbeit eine auffällige Abweichung der ADH-Summen bis zum Erreichen der Verpuppung bei humanem und porkinem Futtersubstrat beobachtet werden und somit ist ein Vergleich zur Literatur weiter eingeschränkt. Die in dieser Arbeit beobachteten ADH-Summen, welche bis zum Erreichen der Verpuppung benötigt wurden, decken sich zumindest teilweise mit bisherigen Ergebnissen von Brown und Harvey (2014) und Kaneshrajah und Turner (2004).

Ein nicht auszuschließender Faktor stellt die Anpassung von Populationen von *C. vicina* an das Klima in Thüringen, Deutschland, dar. Dies kann zu Unterschieden in DTT und Temperaturoptimum für die verwendeten Zuchtpopulationen führen und so den Vergleich mit Literaturdaten erschweren oder zu widersprüchlichen Aussagen führen. In diesem Zusammenhang konnte für *C. vicina* bereits nachgewiesen werden, dass sowohl DTT als auch Temperaturoptimum zwischen geographisch getrennten Populationen divergieren (Hwang und Turner 2009).

In dem hier durchgeführten Experiment konnte ein Einfluss der Spenderspezies auf das Wachstumsverhalten von *C. vicina* grundlegend nachgewiesen werden. Die Ursachen für diesen Unterschied wurden jedoch nicht untersucht und müssen Gegenstand zukünftiger Studien sein.

Es kann ebenfalls nicht ausgeschlossen werden, dass der Nährwertgehalt und die Zusammensetzung von humanem Substrat und industriellem Schweinefleisch unterschiedlich sind. Der Fettgehalt und die Fettverteilung im Muskelgewebe beziehungsweise die Fleischqualität insgesamt könnten ebenso eine mögliche Erklärung darstellen. Weiterhin könnten verwendete Medikamente bzw. Chemikalien und deren Akkumulation im Gewebe einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten haben (Simkiss et al. 1993, Hecht 2005).

Für *C. vicina* wurde eine synanthrope Verbreitung und eine Assoziation zu urbanen, insbesondere zu innerhäuslichen Leichenfunden nachgewiesen (Matuszewski et al. 2010a, Pohjoismaki et al. 2010, Reibe und Madea 2010,

Baz et al. 2015). So könnte das beschleunigte Wachstumsverhalten in Zusammenhang mit dem Besetzen einer ökologischen Nische beurteilt werden. Es bestünde ein Vorteil gegenüber konkurrierenden Spezies – hier sind insbesondere *L. sericata*, *P. terraenovae* und *P. regina* zu nennen – im Kampf um knappe Ressourcen für die Vermehrung in urbanen Gebieten. Das nachgewiesene Wachstumsverhalten wäre somit ein Vorteil bei der Konkurrenz um menschliche Überreste.

9 Schlussfolgerung

Aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit und aus der Kritik in der Literatur an der eingeschränkten Vergleichbarkeit und den divergierenden Ergebnissen bei der PMI_{min}-Bestimmung durch Verwendung unterschiedlicher Experimentalaufbauten (Roe und Higley 2015, Baque und Amendt 2013, Arnaldos et al. 2005, Catts und Goff 1992) folgt, dass in Laborversuchen gewonnene Ergebnisse unter Verwendung nicht-menschlicher Substrate nicht zweifelsfrei auf menschliche Überreste übertragen werden können.

Damit wird die Vergleichbarkeit mit einem bis dato als valide Alternative – porkines Muskelfleisch – geltenden Ersatz zu menschlichen Leichnamen, in forensisch-entomologischen Forschung eingeschränkt. So muss davon ausgegangen werden, dass auch die Vergleichbarkeit mit Erkenntnissen, die auf anderen nicht-menschlichen Nährsubstraten gewonnen wurden, nur eingeschränkt vergleichbar sind.

Es ist jedoch von großer Bedeutung für medico-legale Fälle, dass die Verlässlichkeit und Genauigkeit für die Bestimmung des Madenalters und damit des PMI_{min} gegeben ist. Daraus folgt, dass es unabdingbar ist, weitere Studien durchzuführen, mit dem Ziel, einen einheitlichen Laborstandard für die Durchführung und Erstellung von Vergleichsdaten zur PMI_{min}-Bestimmung zu etablieren. Dazu gehört ein standardisiertes Vorgehen für die Erstellung von Temperatursummationsdaten, Wachstumskurven für die Altersbestimmung von Maden und die Verwendung eines einheitlichen, validen Nährmediums. Dieser Standard muss, trotz des hohen personellen und zeitlichen Aufwandes (Roe und Higley 2015), realisiert werden, um auch in Zukunft die Präzision und Validität der forensischen Entomologie zu sichern.

Darüber hinaus kann aus den Ergebnissen abgeleitet werden, dass weitere Studien unbedingt notwendig sind, um die Vergleichbarkeit von Daten auf Basis nicht-menschlicher Nährmedien mit Daten auf Basis menschlicher Nährmedien herzustellen.

Die direkte Übertragung der gewonnen Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit auf andere forensisch relevante Fliegenarten ist ebenfalls nicht möglich, da auch hier weitere Studien mit unterschiedlichen Fliegenarten von forensischem Interesse notwendig sind.

Bezugnehmend auf Divergenzen in geographisch getrennten Populationen ist es weiterhin dringend erforderlich, dass valide Daten zum Vergleich eben dieser Populationen insbesondere für Deutschland und Staaten Europas erhoben werden, um die forensische Entomologie weiter als standardisierte Methode zur PMI_{min}-Bestimmung vor Gericht zu etablieren.

10 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Adair TW. 2008. *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) collected from a human corpse above 3400 m in elevation. *J Forensic Sci*, 53 (5):1212-1213.
- Amendt J, Campobasso CP, Gaudry E, Reiter C, LeBlanc HN, Hall MJ, European Association for Forensic E. 2007. Best practice in forensic entomology--standards and guidelines. *Int J Legal Med*, 121 (2):90-104.
- Ames C, Turner B. 2003. Low temperature episodes in development of blowflies: implications for postmortem interval estimation. *Med Vet Entomol*, 17 (2):178-186.
- Anderson GS. 2011. Comparison of decomposition rates and faunal colonization of carrion in indoor and outdoor environments. *J Forensic Sci*, 56 (1):136-142.
- Anton E, Niederegger S, Beutel RG. 2011. Beetles and flies collected on pig carrion in an experimental setting in Thuringia and their forensic implications. *Med Vet Entomol*, 25 (4):353-364.
- Arnaldos MI, Garcia MD, Romera E, Presa JJ, Luna A. 2005. Estimation of postmortem interval in real cases based on experimentally obtained entomological evidence. *Forensic Sci Int*, 149 (1):57-65.
- Auberon C, Charabidze D, Devigne C, Delannoy Y, Gosset D. 2015. Experimental study of *Lucilia sericata* (Diptera Calliphoridae) larval development on rat cadavers: Effects of climate and chemical contamination. *Forensic Sci Int*, 253:125-130.
- Baque M, Amendt J. 2013. Strengthen forensic entomology in court--the need for data exploration and the validation of a generalised additive mixed model. *Int J Legal Med*, 127 (1):213-223.
- Baque M, Filmann N, Verhoff MA, Amendt J. 2015. Establishment of developmental charts for the larvae of the blow fly *Calliphora vicina* using quantile regression. *Forensic Sci Int*, 248:1-9.
- Baz A, Botias C, Martin-Vega D, Cifrian B, Diaz-Aranda LM. 2015. Preliminary data on carrion insects in urban (indoor and outdoor) and periurban environments in central Spain. *Forensic Sci Int*, 248:41-47.
- Brinkmann B, Madea B. 2004. *Handbuch gerichtliche Medizin*.
- Brown K, Harvey M. 2014. Optical coherence tomography: age estimation of *Calliphora vicina* pupae in vivo? *Forensic Sci Int*, 242:157-161.
- Brown K, Thorne A, Harvey M. 2015. *Calliphora vicina* (Diptera: Calliphoridae) pupae: a timeline of external morphological development and a new age and PMI estimation tool. *Int J Legal Med*, 129 (4):835-850.

- Campobasso CP, Di Vella G, Introna F. 2001. Factors affecting decomposition and Diptera colonization. *Forensic Sci Int*, 120 (1-2):18-27.
- Catts EP, Goff ML. 1992. Forensic entomology in criminal investigations. *Annu Rev Entomol*, 37:253-272.
- Charabidze D, Bourel B, Gosset D. 2011. Larval-mass effect: Characterisation of heat emission by necrophagous blowflies (Diptera: Calliphoridae) larval aggregates. *Forensic Sci Int*, 211 (1-3):61-66.
- Clark K, Evans L, Wall R. 2006. Growth rates of the blowfly, *Lucilia sericata*, on different body tissues. *Forensic Sci Int*, 156 (2-3):145-149.
- Daniels S, Simkiss K, Smith RH. 1991. A simple larval diet for population studies on the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Med Vet Entomol*, 5 (3):283-292.
- Day DM, Wallman JF. 2006a. Influence of substrate tissue type on larval growth in *Calliphora augur* and *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae). *J Forensic Sci*, 51 (3):657-663.
- Day DM, Wallman JF. 2006b. A comparison of frozen/thawed and fresh food substrates in development of *Calliphora augur* (Diptera: Calliphoridae) larvae. *Int J Legal Med*, 120 (6):391-394.
- Day DM, Wallman JF. 2008. Effect of preservative solutions on preservation of *Calliphora augur* and *Lucilia cuprina* larvae (Diptera: Calliphoridae) with implications for post-mortem interval estimates. *Forensic Sci Int*, 179 (1):1-10.
- Defilippo F, Bonilauri P, Dottori M. 2013. Effect of temperature on six different developmental landmarks within the pupal stage of the forensically important blowfly *Calliphora vicina* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae). *J Forensic Sci*, 58 (6):1554-1557.
- Donovan SE, Hall MJ, Turner BD, Moncrieff CB. 2006. Larval growth rates of the blowfly, *Calliphora vicina*, over a range of temperatures. *Med Vet Entomol*, 20 (1):106-114.
- Faucherre J, Cherix D, Wyss C. 1999. Behavior of *Calliphora vicina* (Diptera, Calliphoridae) Under Extreme Conditions. *Journal of Insect Behavior*, 12 (5).
- Fremdt H, Amendt J. 2014. Species composition of forensically important blow flies (Diptera: Calliphoridae) and flesh flies (Diptera: Sarcophagidae) through space and time. *Forensic Sci Int*, 236:1-9.
- Grassberger M, Reiter C. 2001. Effect of temperature on *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae) development with special reference to the isomegalen- and isomorphen-diagram. *Forensic Sci Int*, 120 (1-2):32-36.
- Grassberger M, Reiter C. 2002. Effect of temperature on development of the forensically important holarctic blow fly *Protophormia terraenovae* (Robineau-Desvoidy) (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Sci Int*, 128 (3):177-182.

- Grassberger M, Frank C. 2004. Initial study of arthropod succession on pig carrion in a central European urban habitat. *J Med Entomol*, 41 (3):511-523.
- Hall M, Donovan S. 2001. Forensic entomology: what can maggots tell us about murders? *Biologist (London)*, 48 (6):249-253.
- Hecht L. 2005. Über den Einfluss toxischer Substanzen auf die Entwicklung der nekrophagen Schmeißfliegenart *Lucilia sericata* im Hinblick auf die Bestimmung der Todeszeit – Dokumentation von Verstorbenen mit Insektenbefall und experimentelle Untersuchungen.: Hamburg.
- Hwang CC, Turner BD. 2009. Small-scaled geographical variation in life-history traits of the blow fly *Calliphora vicina* between rural and urban populations. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 132 (3):218-224.
- Iancu L, Carter DO, Junkins EN, Purcarea C. 2015. Using bacterial and necrophagous insect dynamics for post-mortem interval estimation during cold season: Novel case study in Romania. *Forensic Sci Int*, 254:106-117.
- Ireland S, Turner B. 2006. The effects of larval crowding and food type on the size and development of the blowfly, *Calliphora vomitoria*. *Forensic Sci Int*, 159 (2-3):175-181.
- Johnson AP, Wallman JF. 2014. Effect of massing on larval growth rate. *Forensic Sci Int*, 241:141-149.
- Kaneshraja G, Turner B. 2004. *Calliphora vicina* larvae grow at different rates on different body tissues. *Int J Legal Med*, 118 (4):242-244.
- Mai M, Amendt J. 2012. Effect of different post-feeding intervals on the total time of development of the blowfly *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Forensic Sci Int*, 221 (1-3):65-69.
- Matuszewski S, Bajerlein D, Konwerski S, Szpila K. 2008. An initial study of insect succession and carrion decomposition in various forest habitats of Central Europe. *Forensic Sci Int*, 180 (2-3):61-69.
- Matuszewski S, Bajerlein D, Konwerski S, Szpila K. 2010a. Insect succession and carrion decomposition in selected forests of Central Europe. Part 2: Composition and residency patterns of carrion fauna. *Forensic Sci Int*, 195 (1-3):42-51.
- Matuszewski S, Bajerlein D, Konwerski S, Szpila K. 2010b. Insect succession and carrion decomposition in selected forests of Central Europe. Part 1: Pattern and rate of decomposition. *Forensic Sci Int*, 194 (1-3):85-93.
- Matuszewski S, Fraczak K, Konwerski S, Bajerlein D, Szpila K, Jarmusz M, Szafalowicz M, Grzywacz A, Madra A. 2016. Effect of body mass and clothing on carrion entomofauna. *Int J Legal Med*, 130 (1):221-232.
- Mohr RM, Tomberlin JK. 2014. Environmental factors affecting early carcass attendance by four species of blow flies (Diptera: Calliphoridae) in Texas. *J Med Entomol*, 51 (3):702-708.

- Nabity PD, Higley LG, Heng-Moss TM. 2007. Light-induced variability in development of forensically important blow fly *Phormia regina* (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol*, 44 (2):351-358.
- Niederegger S, Pastuschek J, Mall G. 2010. Preliminary studies of the influence of fluctuating temperatures on the development of various forensically relevant flies. *Forensic Sci Int*, 199 (1-3):72-78.
- Niederegger S, Wartenberg N, Spiess R, Mall G. 2013. Influence of food substrates on the development of the blowflies *Calliphora vicina* and *Calliphora vomitoria* (Diptera, Calliphoridae). *Parasitol Res*, 112 (8):2847-2853.
- Pohjoismaki JL, Karhunen PJ, Goebeler S, Saukko P, Saaksjarvi IE. 2010. Indoors forensic entomology: colonization of human remains in closed environments by specific species of sarcosaprophagous flies. *Forensic Sci Int*, 199 (1-3):38-42.
- Prado e Castro C, Serrano A, Martins Da Silva P, Garcia MD. 2012. Carrion flies of forensic interest: a study of seasonal community composition and succession in Lisbon, Portugal. *Med Vet Entomol*, 26 (4):417-431.
- Reibe S, Madea B. 2010. How promptly do blowflies colonise fresh carcasses? A study comparing indoor with outdoor locations. *Forensic Sci Int*, 195 (1-3):52-57.
- Reiter C. 1984. Growth behavior of the blue blowfly *Calliphora vicina* maggots. *Z Rechtsmed*, 91 (4):295-308.
- Reiter C, Hajek P. 1984. Age-dependent changes in the intestinal contents of blowfly maggots--a study method in the framework of forensic determination of the time of death. *Z Rechtsmed*, 92 (1):39-45.
- Richards CS, Villet MH. 2008. Factors affecting accuracy and precision of thermal summation models of insect development used to estimate post-mortem intervals. *Int J Legal Med*, 122 (5):401-408.
- Richards CS, Villet MH. 2009. Data quality in thermal summation development models for forensically important blowflies. *Med Vet Entomol*, 23 (3):269-276.
- Richards CS, Rowlinson CC, Hall MJ. 2013a. Effects of storage temperature on the change in size of *Calliphora vicina* larvae during preservation in 80% ethanol. *Int J Legal Med*, 127 (1):231-241.
- Richards CS, Rowlinson CC, Cuttiford L, Grimsley R, Hall MJ. 2013b. Decomposed liver has a significantly adverse affect on the development rate of the blowfly *Calliphora vicina*. *Int J Legal Med*, 127 (1):259-262.
- Roe A, Higley LG. 2015. Development modeling of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *PeerJ*, 3:e803.
- Saunders DS. 1997. Insect circadian rhythms and photoperiodism. *Invert Neurosci*, 3 (2-3):155-164.

- Schröder H, Klotzbach H, Oesterhelweg L, Gehl A, Püschel K. 2001. Artenspektrum und zeitliches Auftreten von Insekten an Wohnungsleichen im Großraum Hamburg. *Rechtsmedizin*, 11 (2):59-63.
- Schroeder H, Klotzbach H, Püschel K. 2003. Insects' colonization of human corpses in warm and cold season. *Legal Medicine*, 5:S372-S374.
- Simkiss K, Daniels S, Smith RH. 1993. Effects of population density and cadmium toxicity on growth and survival of blowflies. *Environ Pollut*, 81 (1):41-45.
- Slone DH, Gruner SV. 2007. Thermoregulation in larval aggregations of carrion-feeding blow flies (Diptera: Calliphoridae). *J Med Entomol*, 44 (3):516-523.
- Tachibana S, Numata H. 2001. An artificial diet for blow fly larvae, *Lucilia sericata* (Meigen) (Diptera: Calliphoridae). *Appl Entomol Zool*, 36 (4):521-523.
- VanLaerhoven SL. 2008. Blind validation of postmortem interval estimates using developmental rates of blow flies. *Forensic Sci Int*, 180 (2-3):76-80.
- Wartenberg N. 2012. Einfluss des Futtersubstrates auf die Entwicklung forensisch relevanter Fliegenmaden und Etablierung einer neuen Methode zur Artbestimmung
- Williams H, Richardson AMM. 1984. Growth energetics in relation to temperature for larvae of four species of necrophagous flies (Diptera: Calliphoridae). *Australian Journal of Ecology*, 9:141-152.

11 Anhang

11.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklungsstadien von Schmeißfliegen (by M.Hall, Natural History Museum, London)	7
Abbildung 2: Taxonomie von <i>Calliphora vicina</i> , Stellung innerhalb der Diptera (Wartenberg 2012)	8
Abbildung 3: Gazezuchtkäfig mit circa 100 adulten Fliegen (<i>C. vicina</i>) (Wartenberg 2012)	15
Abbildung 4: Aufbau und Verteilung der Faunarien und Substratbecher. A Faunarien mit Einstreu, Trennwand und zwei Substratbechern. B Verteilung der Faunarien im Klimasimulationsschrank. C Beispielhafter Substratbecher mit Substrat und Maden (Wartenberg 2012)	17
Abbildung 5: Position und Messtrecke exemplarisch an einer Made von <i>C. vicina</i> (rote Linie: Messtrecke von rostral zu Ende des letzten Abdominalsegments (Wartenberg 2012))	20
Abbildung 6: Balkendiagramm	26
Abbildung 7: Boxplot der Rohdaten mit Markierungen der „ ° “ = Ausreißer, „ * “ = Extremwerte jeweils mit Verweis auf Nummerierung in SPSS für Substrat: Schwein.	30
Abbildung 8: Boxplot der Rohdaten mit Markierungen der „ ° “ = Ausreißer, „ * “ = Extremwerte jeweils mit Verweis auf Nummerierung in SPSS für Substrat: Mensch	30
Abbildung 9: Gemessene Mittelwerte Madenlängen des Versuchsdurchganges S_1	32
Abbildung 10: Gemessene Mittelwerte Madenlängen des Versuchsdurchganges S_2	32
Abbildung 11: Gemessene Mittelwerte Madenlängen des Versuchsdurchganges S_3	33

Abbildung 12: Gemessene Mittelwerte Madenlängen des Versuchsdurchganges S_4.....	33
Abbildung 13: Gemessene Mittelwerte Madenlängen des Versuchsdurchganges M_1	34
Abbildung 14: Gemessene Mittelwerte Madenlängen des Versuchsdurchganges M_2.....	
Abbildung 15: Gemessene Mittelwerte Madenlängen des Versuchsdurchganges M_3.....	
Abbildung 16: Gemessene Mittelwerte Madenlängen des Versuchsdurchganges M_4.....	34
Abbildung 17: Graph der Mittelwerte aller Experimentaldurchgänge	36
Abbildung 18: Graph zum geschätzten Randmittel für „Datensatz1“ mit Konfidenzintervall von 99,81%.....	41
Abbildung 19: Graph zum geschätzten Randmittel für „Datensatz2“ mit Konfidenzintervall von 99,81%.....	42

11.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Dargestellt sind Messintervalle von 4h mit der dazugehörigen, überdeckten Zeitspanne ab Eiablage und den eingeschlossenen Messzeitpunkten mit zugehöriger Versuchsnummer.....	23
Tabelle 2: Übersichtstabelle für Versuche mit Schwein S_1 bis S_4 mit Datenpunkten, Messzeitpunkten und Stichprobengrößen.....	25
Tabelle 3: Übersichtstabelle für Versuche mit Mensch M_1 bis M_4 mit Datenpunkten, Messzeitpunkten und Stichprobengrößen.....	25
Tabelle 4: Zeiten in Stunden[h] bis zum Auftreten der ersten Puppe und bis 50% aller verbleibenden Larven verpuppt waren	27
Tabelle 5: Minimale und maximale Madenlänge der Versuche mit porkinem Substrat.....	28
Tabelle 6: Minimale und maximale Madenlänge der Versuche mit humanem Substrat.....	28
Tabelle 7: Ausreißer und Extremwerte.....	29
Tabelle 8: Ergebnisse des linear unabhängigen paarweisen Vergleichs für „Datensatz1“ je Messintervall zwischen den geschätzten Randmittel mit einem Signifikanzniveau von 99,81%.	43
Tabelle 9: Ergebnisse des linear unabhängigen paarweisen Vergleichs für „Datensatz2“ je Messintervall zwischen den geschätzten Randmittel mit einem Signifikanzniveau von 99,81%.	44
Tabelle 10: Gegenüberstellung Signifikanzen der Datensätze „Datensatz1“ und „Datensatz2“ je Messintervall mit einem Signifikanzniveau von 99,81%.....	45

11.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. G. Mall und Frau Dr. S. Niederegger für die Ermöglichung und Finanzierung dieser Dissertation bedanken.

Mein besonderer Dank für Unterstützung und beratende Tätigkeit bei der Erstellung der gesamten Arbeit gilt Frau Dr. S. Niederegger, die mir immer freundlich und hilfsbereit, trotz oder gerade bei schwierigen Abschnitten mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ebenso möchte ich meinen Dank gegenüber Fr. Dr. H. Hoyer und Herrn Dr. M. Hubig für die Geduld bei der Erklärung statistischer Fragen und Unterstützung einer korrekten Methodik für Auswertung zu finden ausdrücken.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau R. Straube, einer guten Freundin, die sachlich und zügig meine Texte Korrektur gelesen und mir wertvolle Hinweise gegeben hat.

Meinen Eltern möchte ich dafür danken, dass sie mich trotz Bedenken immer in der Entscheidung eine Dissertation anzufertigen unterstützt haben und mir sogar eine Auszeit während des Studiums für die Experimente ermöglicht haben.

Zum Schluss will ich den größten Dank jedoch an meine Frau richten, die mich immer wieder aufgebaut hat, wenn ich schon aufgeben wollte.

11.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

- Frau Dr. H. Hoyer, IMSID der medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität,
- Herr Dr. M. Hubig, Institut der Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Jena,
- Frau Dr. S. Niederegger, Institut der Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Jena,
- Frau Prof. Dr. G. Mall, Institut der Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Jena,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde

und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum.....Unterschrift des Verfassers